

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Fauler

Untersuchung von Arzneimittelrückständen im Abwasser der Stadt Dresden

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Gesundheitswissenschaften
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von
Diplom-Chemiker Robert Gurke
aus Malchin

Dresden 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Fauler
2. Gutachter: Prof. Dr. Dimitrios Tsikas

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2016

gez: Prof. Dr. Marc Schmitz
Vorsitzender der Promotionskommission

Gewidmet meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Hintergrund.....	8
1.2	Zielstellung der Arbeit	12
2	Methodenentwicklung	13
2.1	Analytauswahl und Untersuchungsgebiet	13
2.2	Probenvorbereitung und Festphasenextraktion.....	15
2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie	17
3	Monitoring der Kläranlage Dresden-Kaditz	20
4	Diskussion	25
5	Fazit	28
6	Zusammenfassung	30
7	Summary	33
8	Literaturverzeichnis	35
9	Abkürzungsverzeichnis	40
10	Tabellenverzeichnis	41
11	Abbildungsverzeichnis	42
12	Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens	43
13	Erklärung zur Einhaltung rechtlicher Vorschriften	46
14	Anhang	47
14.1	Artikel Nr. 1: „Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples”	47
14.2	Artikel Nr. 2: „Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant”	67
15	Danksagung	83

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Humanarzneimittel sind ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin und die jährlichen Verschreibungsmengen in Deutschland steigen stetig (Schwabe und Paffrath, 2014). Der Verbrauch lag im Jahr 2013 bei 38,3 Milliarden definierten Tagesdosen (defined daily dosis, DDD)¹. Am häufigsten wurden Antihypertensiva, wie z. B. die Hemmstoffe des Angiotensin-Konversionsenzyms (ACE-Hemmer) Ramipril und Enalapril bzw. die Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten (AT₁-Rezeptorantagonisten) Valsartan und Candesartan, sowie die Antibiotika Amoxicillin, Doxycyclin und Clindamycin verordnet. Aufgrund des demografischen Wandels ist davon auszugehen, dass der Verbrauch auch in den kommenden Jahren weiter ansteigen wird (Umweltbundesamt, 2014). Dabei ist zu beachten, dass durch die zunehmende Urbanisierung die Einnahme und Ausscheidung der Arzneimittel auf immer kleinerem Raum erfolgt. Nach der Einnahme werden die Arzneimittel im menschlichen Körper metabolisiert und die entstehenden Metaboliten sowie das unveränderte Arzneimittel über Urin und Fäzes in das Abwasser ausgeschieden. Sie gelangen so durch das Kanalnetzsystem zur Kläranlage. Dabei können Punktquellen (z. B. Krankenhäuser) und diffuse Quellen (Haushalte) im Einzugsgebiet einer Kläranlage unterschieden werden (s. Abb. 1).

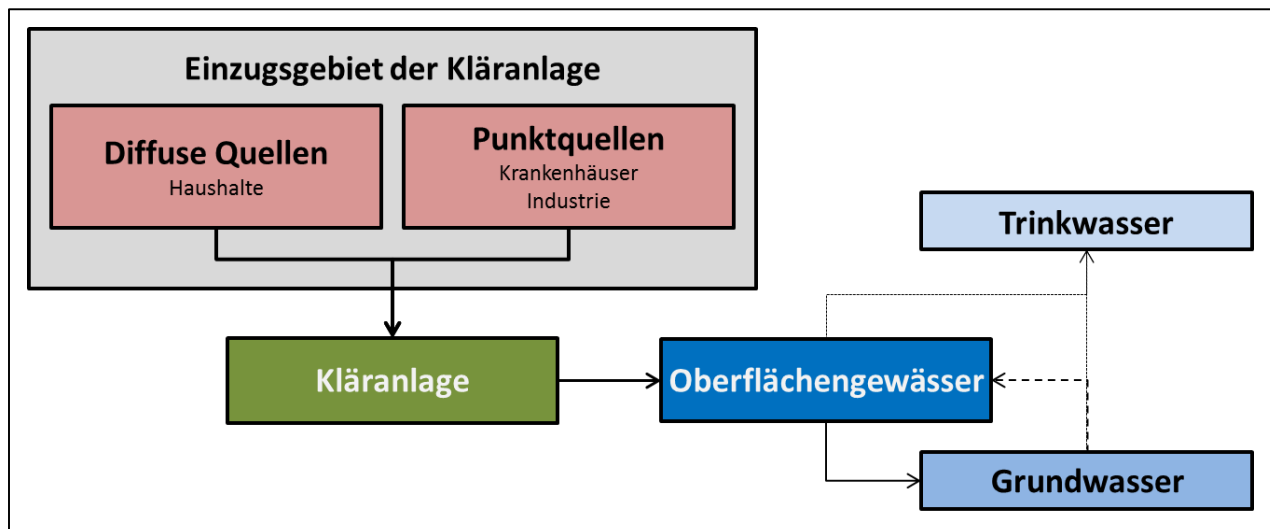


Abbildung 1: Eintragswege von Arzneimitteln nach humanem Gebrauch über die Kläranlage in die Umwelt, vereinfachte Darstellung nach Umweltbundesamt (2014), veröffentlicht in Timpel et al. (im Druck).

¹ Dies umfasst alle Verschreibungen der gesetzlichen Krankenkassen, nicht aber die der privaten Krankenkassen. DDD (Defined Daily Dose) ist die Menge eines Arzneimittels, die typischerweise für die Hauptindikation bei Erwachsenen pro Tag angewendet wird.

Seit mehreren Jahrzehnten werden Arzneimittel und deren Metaboliten in Abwasser, Oberflächenwasser und einige sogar im Trinkwasser nachgewiesen. Eine der ersten Arbeiten, die den Eintrag von Arzneistoffen in die Umwelt beschrieben hat, wurde 1977 von Hignite und Azarnoff veröffentlicht. Die Autoren konnten mittels Gaschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) Clofibrinsäure und Salicylsäure (s. Abb. 2), die Metaboliten des Clofibrats (Lipidsenker) und der Acetylsalicylsäure (Analgetikum), im Abwasser der Stadt Kansas City nachweisen (Hignite und Azarnoff, 1977).

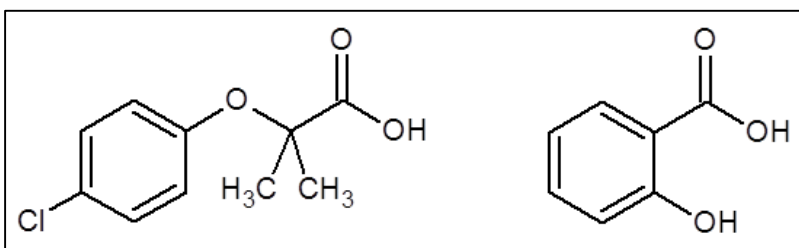


Abbildung 2: Clofibrinsäure (links) und Salicylsäure (rechts).

In Deutschland wurde 1995 durch Heberer et al. erstmals eine Studie veröffentlicht, in der das Vorkommen von Arzneimitteln und deren Metaboliten im Ab-, Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser nachgewiesen werden konnte. Ursprüngliches Ziel der Untersuchung war der Nachweis von Herbiziden in aquatischen Proben. Die Analysen zeigten jedoch, dass nicht wie vermutet für Pestizide, sondern für Clofibrinsäure die höchste Konzentration nachgewiesen werden konnte, also die gleiche Substanz, die bereits von Hignite und Azarnoff im Abwasser detektiert wurde. Seit dem erstmaligen Nachweis von Arzneimitteln und Arzneimittelmetaboliten in aquatischen Umweltproben konnte eine Vielzahl weiterer Wirkstoffe im Abwasser und Oberflächenwasser und teilweise auch im Grund- bzw. Trinkwasser nachgewiesen werden. Wirkstoffe, wie z. B. Carbamazepin (Antiepileptikum), Metoprolol (Betablocker), Sulfamethoxazol und Trimethoprim (Antibiotika), Diclofenac (Analgetikum) oder Bezafibrat (Lipidsenker), wurden vielfach und in unterschiedlichsten Konzentrationen von wenigen Nanogramm bis zu mehreren Mikrogramm pro Liter in Abwässern und Oberflächengewässern nachgewiesen (Ternes, 1998; Metcalfe et al., 2003; Wiegel et al., 2004; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Oosterhuis et al., 2013). Dabei konnte wiederholt festgestellt werden, dass die momentan eingesetzte Technik der Abwasserbehandlung nicht geeignet ist, Arzneimittel und deren Metaboliten aus dem Abwasser zu entfernen (Verlicchi et al., 2012; Luo et al., 2014; Petrie et al., 2014). Mit dem Abwasser erreichen die Arzneimittel und deren Metaboliten das Oberflächenwasser und können von dort in das Grundwasser (Vulliet und Cren-Olivé, 2011; López-Serna et al., 2013) und in Spuren auch in das Trinkwasser (Mompelat et al., 2009; Valcárcel et al., 2011) gelangen (s. Abb. 1).

Welche Auswirkungen diese anthropogenen Spurenstoffe auf Organismen in der Umwelt haben können, ist oftmals nur unzureichend untersucht. Es gibt einige Beispiele, die verdeutlichen, was für schwerwiegende Folgen der Eintrag von Arzneimitteln in die Umwelt haben kann. Im Jahr 2004 veröffentlichten Oaks et al. eine Studie, in der gezeigt wurde, dass der Zusammenbruch der Bengalgeier-Population in Indien und Pakistan durch das Analgetikum Diclofenac verursacht wurde (Oaks et al., 2004). Die Geier fraßen verendete Rinder, die zuvor mit Diclofenac behandelt worden waren. Auch wenn hier kein Eintrag in die aquatische Umwelt vorliegt, so verdeutlicht dieses Beispiel sehr gut, welche Folgen durch den Kontakt bzw. die Aufnahme von Arzneimitteln in der Umwelt hervorgerufen werden können.

Es gibt aber auch Beispiele für die Auswirkungen von Arzneimitteln in der aquatischen Umwelt. Durch den Eintrag von Ethinylestradiol, welches in Kontrazeptiva Verwendung findet, können bei Fischen Reproduktionsfehler hervorgerufen werden (Nash et al., 2004). Ein weiteres Beispiel ist der Eintrag von Antibiotika in das Abwasser, welcher dazu führt, dass sich zunehmend resistente Bakterien entwickeln (Kümmerer und Henninger, 2003). Meist sind nicht nur einige Arzneistoffe, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Arzneimittel im Abwasser vorhanden. Ob dieser Arzneimittelcocktail trotz der geringen Konzentrationen der einzelnen Arzneimittel zu einer Schädigung von aquatischen Organismen führt, ist bisher wenig untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass die Auswirkungen durch Mischungen verschiedener Wirkstoffe stärker ausfallen, als es die einzelnen Komponenten verursachen könnten (Kostich und Lazorchak, 2008).

Bei der Behandlung von Menschen sind Arzneimittel als Fremdstoffe zu sehen, die in den Organismus aufgenommen und wieder ausgeschieden werden. Teilweise werden die Arzneimittel unverändert über den Urin aus dem Körper eliminiert. In Abhängigkeit vom Wirkstoff können Anteile des Arzneimittelmoleküls nicht direkt über den Urin ausgeschieden werden und müssen zur Verbesserung der Hydrophilie in der Leber metabolisiert werden. Historisch wird die Metabolisierung in zwei Phasen unterteilt (Gonzalez und Tukey, 2006). In Phase I erfolgen oxidative, reduktive oder hydrolytische Reaktionen, wie z. B. Dealkylierung, Dehalogenierung oder Esterspaltung. Phase-II-Reaktionen sind beispielsweise Glucuronidierung oder Acetylierung. Diese Kopplungsreaktionen tragen dazu bei, die Hydrophilie der Phase-I-Metaboliten, aber auch des unveränderten Arzneimittels selbst, weiter zu erhöhen.

Der Metabolismus und die Exkretion der Arzneimittel sind stark substanzabhängig. Venlafaxin (Antidepressivum) wird z. B. nur zu 4,7 % unverändert ausgeschieden (Howell et al., 1993). Gabapentin (Antiepileptikum) hingegen wird nicht metabolisiert und 100 % der eingesetzten Dosis verlassen den Körper als unverändertes Gabapentin (Ketter et al., 1999). Abbildung 3

zeigt den Metabolismus von Venlafaxin beim Menschen. Neben der Ausscheidung des unveränderten Venlafaxins können etwa 29 % der Venlafaxin-Dosis im Urin als O-Desmethylvenlafaxin (ODV) und weitere 26 % als glucuronidiertes ODV detektiert werden (Howell et al., 1993).

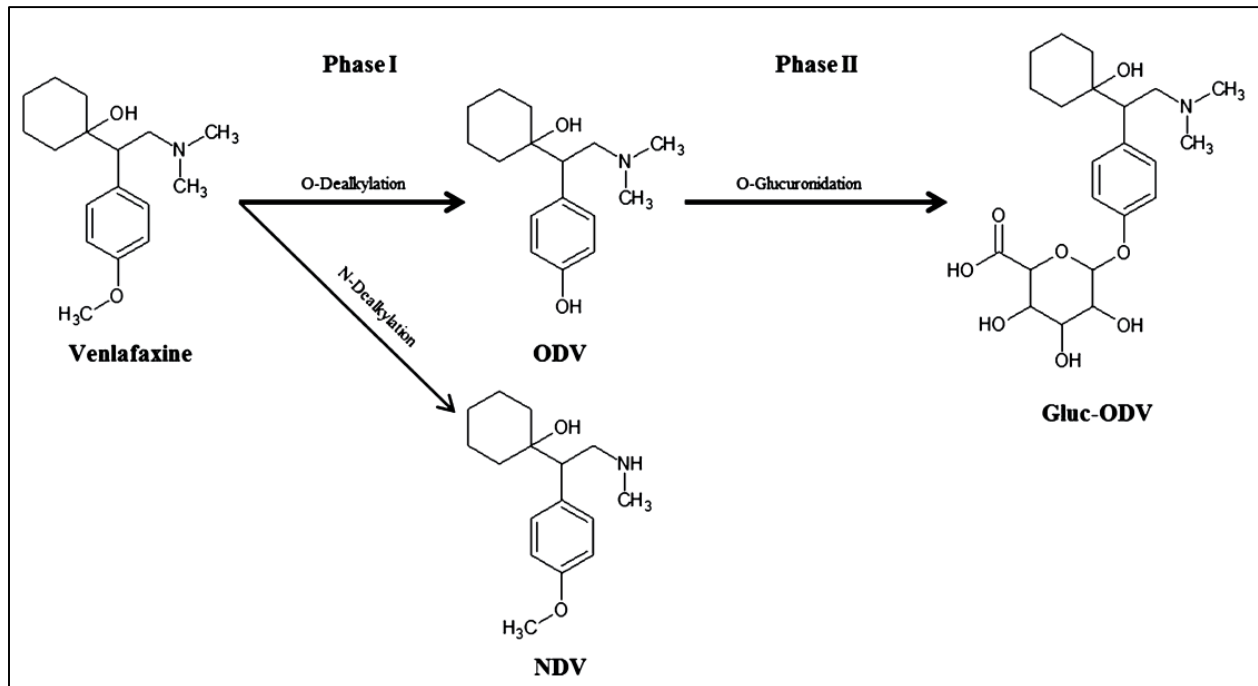


Abbildung 3: Metabolismus des Venlafaxin nach Howell et al. (1993), veröffentlicht in Gurke et al. (2015b); ODV: O-Desmethylvenlafaxin, NDV: N-Desmethylvenlafaxin, Gluc-ODV: glucuronidiertes O-Desmethylvenlafaxin.

Damit die vollständige Umweltbelastung durch Arzneimittel quantitativ erfasst werden kann, genügt es folglich nicht, nur das ausgeschiedene Arzneimittelmolekül zu messen, sondern es müssen auch die Metaboliten berücksichtigt werden. Da die Aktivität der am Metabolismus beteiligten Enzyme zum Teil einer genetischen Variabilität unterliegt, ist eine quantitative Schätzung der ausgeschiedenen Metabolitmenge über das Verhältnis von Arzneimittel zu Metaboliten nur eingeschränkt möglich. Bisher wurden die Arzneimittelmetaboliten bei Messungen im Abwasser oftmals vernachlässigt oder nur einzelne Metaboliten untersucht (Metcalf et al., 2003; Lajeunesse et al., 2012; Kaiser et al., 2014). Dies liegt zum einen daran, dass relevante Metaboliten nicht bekannt sind oder deren Standards für die Analytik nicht zur Verfügung stehen bzw. deren Erwerb mit hohen Kosten verbunden ist.

1.2 Zielstellung der Arbeit

Die Bestimmung von Arzneimitteln und deren Metaboliten in wässrigen Proben erfolgt zumeist nach Anreicherung und Aufreinigung der Proben mittels Extraktion, gefolgt von chromatographischer Separation mit anschließender massenspektrometrischer Detektion. Dabei ist die Auswahl der Zielmoleküle ein kritischer Punkt in der Entwicklung einer geeigneten Methode für die Analyse und das Monitoring derartiger Proben. In Deutschland sind ca. 2 300 Wirkstoffe in der Humanmedizin zugelassen (Umweltbundesamt, 2014), welche substanzspezifisch in sehr unterschiedlichem Ausmaß im menschlichen Körper metabolisiert werden. Für das Einzugsgebiet der Kläranlage Dresden-Kaditz können auf Grundlage der ambulanten Verschreibungsdaten, die durch die Krankenversicherung AOK PLUS zur Verfügung gestellt werden, die Verbrauchsmengen der Arzneimittel abgeschätzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf den Verschreibungsdaten Arzneimittel auszuwählen und im Abwasser nachzuweisen. Nach Möglichkeit sollten relevante Metaboliten identifiziert und ebenfalls in die Analytikmethode integriert werden. Dazu musste der Metabolismus der Wirkstoffe anhand von Literaturdaten nachvollzogen werden. Für den Nachweis der Analyten sollte eine geeignete Methodik basierend auf Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE), Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) unter Verwendung der positiven Elektrosprayionisation (ESI) entwickelt werden. Ziel war es weiterhin, durch ein mehrtägiges Monitoring der Kläranlage Dresden-Kaditz die Eliminierungsraten der Arzneimittel und Metaboliten während der Passage der Kläranlage zu bestimmen.

2 Methodenentwicklung

Um den Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand bei der Analyse der Abwasserproben so gering wie möglich zu halten, sollte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, alle ausgewählten Arzneimittel in einer einzigen Analyse zu erfassen. Aufgrund der chemischen Diversität der Analyten waren hierfür geeignete Techniken der Extraktion, Separation und Detektion auszuwählen, die ein möglichst weites Spektrum der Zielmoleküle abdecken. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen verwenden hierfür meistens eine Kombination aus SPE, HPLC und MS/MS (Ferrer und Thurman, 2013; Petrovic, 2014). Basierend auf den Arbeiten von Rossmann et al. (2014) wurde eine ursprünglich für Antibiotika entwickelte SPE-HPLC-MS/MS-Methode weiterentwickelt und modifiziert, sodass sie für die Analyse von 49 Arzneimitteln verschiedener Wirkstoffklassen und sieben ausgewählte Metaboliten geeignet war.

2.1 Analytauswahl und Untersuchungsgebiet

Die Auswahl der Arzneimittel wurde basierend auf der Auswertung der regionalen Verschreibungsdaten der AOK PLUS Sachsen und Thüringen durchgeführt. Durchschnittlich 40 % der Einwohner Dresdens sind bei dieser gesetzlichen Krankenkasse versichert. Es wurden die jährlichen Verbrauchsdaten verschreibungspflichtiger Arzneimittel unter Verwendung der Klassifizierung nach dem anatomisch-therapeutisch-chemischen Klassifikationssystem (ATC) in Kombination mit den definierten Tagesdosen (DDD) für den Zeitraum 2008 bis 2012 ausgewertet. Die Daten wurden anhand der Postleitzahlen für das Stadtgebiet Dresden analysiert. Dabei wurden vor allem Arzneimittel mit hohen Verschreibungsmengen ausgewählt. Weiterhin wurden Analyten mit geringeren Verschreibungsmengen berücksichtigt, um zu prüfen, bei welchen Verschreibungsmengen die Nachweisgrenze liegt. Hierbei ist jedoch auch der Metabolismus zu berücksichtigen, denn hohe Verschreibungsmengen führen bei starker Metabolisierung des Wirkstoffs nicht zwangsläufig zu hohen Analytkonzentrationen im Abwasser.

Es wurden Analyten aus den Wirkstoffklassen der ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten, Antiarrhythmika, Antibiotika, Antiepileptika, Antidepressiva, Antimykotika, Neuroleptika, Betablocker, Calciumantagonisten, Diuretika, Lipidsenker, Opioid-Analgetika und Vasodilatoren berücksichtigt. Dabei wurden bereits vielfach untersuchte Analyten, wie z. B. Carbamazepin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim, Metoprolol und Bezafibrat, aber auch Analyten, die bisher weniger untersucht wurden, wie z. B. Pregabalin, Topiramat, Quetiapin oder

Telmisartan (Petrovic, 2014), berücksichtigt. Insgesamt wurden 56 Analyten (49 Arzneimittel und sieben Metaboliten) analysiert (s. Tab. 1). Komponenten, die nicht mit Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase, RP) bzw. positiver ESI analysierbar sind, wurden von vornherein ausgeschlossen.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Arzneimittel und Metaboliten (CLS: Clindamycin-Sulfoxid, MHD: 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepin, NCL: N-Desmethylozapin, NCI: N-Desmethyloitalopram, NFL: Norfluoxetin, NMI: N-Desmethyloirtazapin, ODV: O-Desmethylovenlafaxin), entnommen aus Gurke et al. (2015a).

Wirkstoffklasse	Analyt	Wirkstoffklasse	Analyt
ACE ¹ -Hemmer	Enalapril	Antidepressivum	Mirtazapin
	Ramipril		NMI
Angiotensin-Rezeptor-Antagonist	Candesartan		Paroxetin
	Eprosartan		Sertralin
	Irbesartan		Trimipramin
	Losartan		Venlafaxin
	Telmisartan		ODV
	Valsartan	Antimykotikum	Fluconazol
Antiarrhythmikum	Propafenon		Voriconazol
	Sotalol	Neuroleptikum	Clozapin
Antibiotikum	Clindamycin		NCL
	CLS ²		Haloperidol
	Sulfamethoxazol		Melperon
	Trimethoprim		Quetiapin
Antiepileptikum	Carbamazepin	Betablocker	Atenolol
	Gabapentin		Bisoprolol
	Lamotrigin		Carvedilol
	Levetiracetam		Celiprolol
	Oxcarbazepin		Metoprolol
	MHD		Propranolol
	Pregabalin		Talinolol
	Primidon	Calciumantagonist	Diltiazem
	Topiramat	Diuretikum	Torasemid
Antidepressivum	Amitriptylin		Triamteren
	Citalopram	Lipidsenker	Bezafibrat
	NCI	Opioid-Analgetikum	Tramadol
	Doxepin	Vasodilatoren	Pentoxifyllin
	Fluoxetin		
	NFL		

¹ Angiotensin-Konversionsenzym

² Wurde nachträglich in die Methode integriert.

Als Untersuchungsgebiet wurde das Einzugsgebiet der Kläranlage Dresden-Kaditz ausgewählt. Die Kläranlage ist dafür ausgelegt, das Abwasser von 740 000 Einwohneräquivalenten mit einem jährlichen Volumen von 55 Millionen Kubikmetern zu reinigen. Im Durchschnitt besitzt die Kläranlage eine hydraulische Retentionszeit von 24 Stunden. Das Einzugsgebiet der Kläranlage umfasst das Gebiet der Stadt Dresden sowie der umliegenden Städte und Gemeinden Pirna, Heidenau, Dohna, Freital, Tharandt, Radebeul Ost und Bannewitz (Lucke, 2014). Insgesamt wird gegenwärtig das Abwasser von etwa 650 000 Einwohner in die Kläranlage eingeleitet (Marx et al., 2015). Das Abwassersystem der Stadt funktioniert hauptsächlich als Mischwasserkanalisation. Dabei wird neben den häuslichen und industriellen Abwässern auch das Regen-

wasser durch die Kanalisation abgeleitet und gelangt so in die Kläranlage Dresden-Kaditz (s. Abb. 3).

Ziel der Untersuchung war die Berechnung der Eliminationsraten der einzelnen Analyten aus der wässrigen Phase des Abwassers unter Vernachlässigung der Analyse von an Schwebstoffe gebundenen oder im Klärschlamm befindlichen Arzneimitteln. Majewsky et al. (2011) publizierten dazu eine Studie, in der sie darstellen, dass für diese Berechnung die einfache Berücksichtigung der hydraulischen Retentionszeit des Abwassers in der Kläranlage nicht ausreicht. Vielmehr ist es notwendig, flussproportionale Proben von aufeinanderfolgenden Tagen des Zu- und Ablaufes zu analysieren (Ort et al., 2010). Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben erfolgte die Probennahme als flussproportionale 24 Stunden-Mischprobe im Zulauf, nach der Vorklärung und im Ablauf der Kläranlage (s. Abb. 4). Dabei nahm der Probennehmer (ASP Station 2000, Endress+Hauser, Reinach, Schweiz) ein Probenvolumen von 25 mL pro 480 m³ Durchflussvolumen. Die Proben wurden an jedem Tag um 8 Uhr aus dem Probennehmer entnommen und 50 mL der Probe wurden in ein Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) transferiert. Die Proben wurden bis zur Analyse, aber maximal für vier Tage, bei plus 4°C im Dunkeln gelagert.

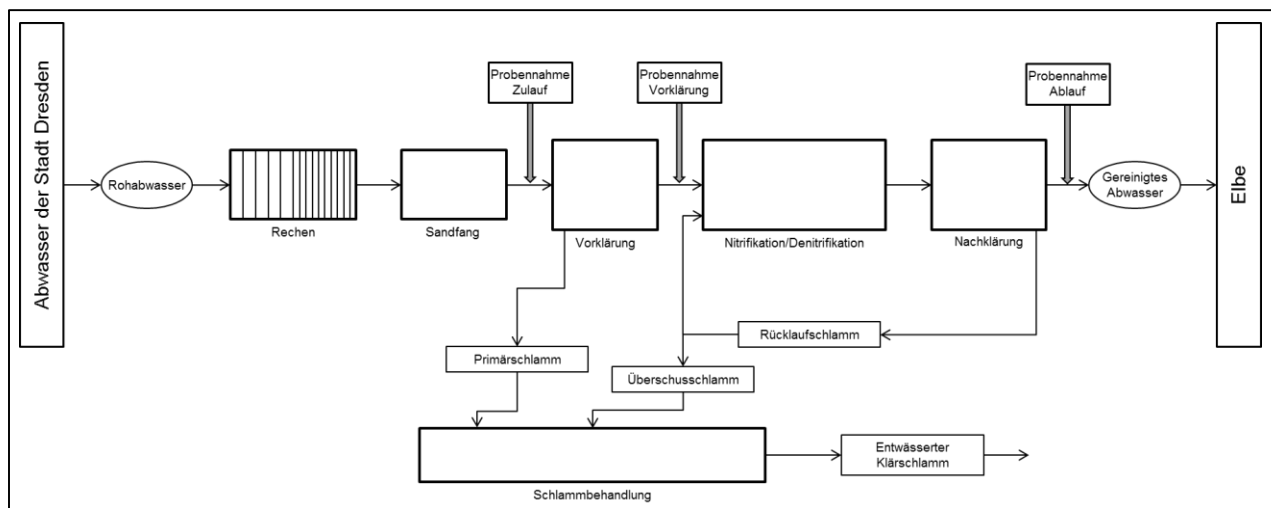


Abbildung 4: Abwasserbehandlung in der Kläranlage Dresden-Kaditz, vereinfachte Darstellung nach Lucke (2014).

2.2 Probenvorbereitung und Festphasenextraktion

Durch die Anwendung der SPE können zwei wichtige Vorbereitungsschritte vereint werden. Zuerst wird die Probe aufgereinigt und störende Matrixkomponenten werden entfernt. Im Anschluss erfolgt eine Aufkonzentration der Analyten, was zu einer niedrigeren

Quantifizierungsgrenze führt (Gey, 2008). Bei der SPE wird die (Abwasser-)Probe nach geeigneter Probenvorbereitung über ein festes Sorbens geleitet und die Extraktionskartusche mit den Analyten beladen. In Abhängigkeit vom jeweiligen Analyten werden diese unterschiedlich gut durch das Sorbens zurückgehalten und Matrixkomponenten, wie z. B. Salze, werden von den Analyten getrennt, da sie nicht auf der Säule verbleiben. Durch einen Waschschriff wird die Probe weiter aufgereinigt und im Anschluss mit einem geeigneten Solvens von der Kartusche eluiert. Die Eluate werden nahezu komplett eingetrocknet und anschließend in einem für die Injektion in das Chromatographiesystem geeigneten Solvens aufgenommen.

Alle Abwasserproben wurden automatisiert mit einem Abimed ASPEC XL (Gilson, Middleton, WI, USA), unter Verwendung von Oasis HLB 1cc (10 mg) Extraktionskartuschen (Waters, Milford, MA, USA), extrahiert. Vor der Extraktion wurden 50 mL Probe mit 500 μL Na_2EDTA -Lösung (80 mg mL^{-1}) versetzt, fünf Minuten geschüttelt und im Anschluss drei Minuten lang bei $6000 \times g$ zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Die zentrifugierten Proben wurden mit einem vorgespülten Glasfaserfilter ($0,9 \mu\text{m}$, WICOM, Heppenheim, Deutschland) filtriert, mit zehnpromzentiger Ameisensäure auf den pH-Wert 3 eingestellt, mit $100 \mu\text{L}$ einer Lösung, die $10 \mu\text{g L}^{-1}$ des Internen Standards (IS) enthält, versetzt und gevortext. Die so präparierten Proben wurden im Anschluss mit dem in Abbildung 5 dargestellten SPE-Programm extrahiert.

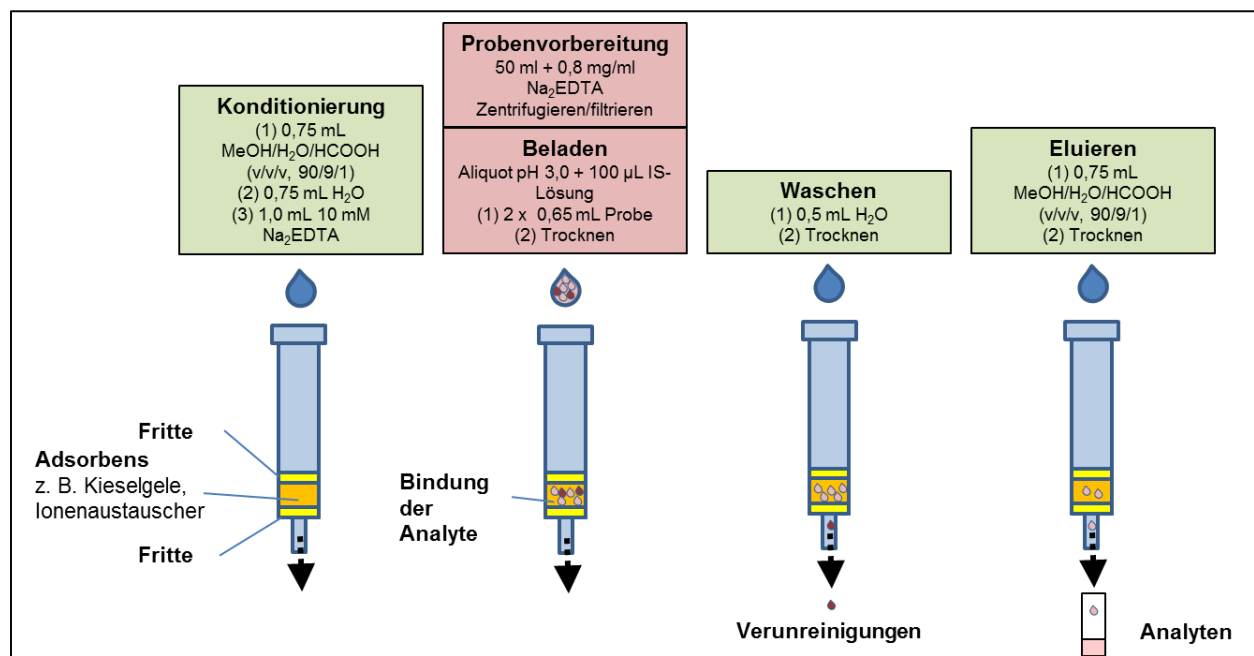


Abbildung 5: Extraktion von Abwasserproben nach Gurke et al. (2015b).

Die Eluate wurden mit 25 μ L Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt, gevortext und bei 50°C unter einem Luftstrom eingengt. Das DMSO verhindert das vollständige Eintrocknen der Probe und ermöglicht die vollständige Aufnahme der Analyten im Laufmittel A (97/3/0,05; v/v/v - 2 mM Ammoniumacetat-Lösung, Acetonitril und Ameisensäure), was die Peakform der polaren Analyten stark verbessert.

2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie

Für die chromatographische Separation der Analyten können verschiedene Techniken, wie z. B. RP-Chromatographie oder hydrophile Interaktionschromatographie (hydrophilic interaction chromatography, HILIC), eingesetzt werden. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie, die für die meisten Untersuchungen verwendet wird (Ferrer und Thurman, 2013), handelt es sich um eine Form der Adsorptionschromatographie unter Verwendung einer unpolaren festen und einer polareren flüssigen Phase. Beim Durchlaufen der Chromatographiesäule kommt es zu einem ständigen Austausch der Analyten zwischen flüssiger und fester Phase und, je nachdem wie gut der Analyt an die feste Phase adsorbiert, wird er länger auf der Säule retardiert (Gey, 2008). Um die Trennung zu beschleunigen und die Peakform zu verbessern, kann ein Gradient eingesetzt werden. Dabei startet man mit einem polaren Laufmittel (z. B. Wasser) und mischt dieses im Verlauf der Trennung mit einem steigenden Anteil eines unpolaren Laufmittels (z. B. Acetonitril). So kann das Gleichgewicht, das sich zwischen flüssiger und fester Phase einstellt, auch für stärker adsorbierende Analyten in Richtung der flüssigen Phase verschoben werden.

Auch bei der massenspektrometrischen Detektion der Analyten nach der chromatographischen Separation können verschiedene Systeme eingesetzt werden. Als sehr robustes System hat sich dabei die Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Triple-Quadrupol (QqQ) Gerätes erwiesen. Die Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie kann mittels Elektrosprayionisation erfolgen. Die ESI gehört zu den Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden und ist eine der wichtigsten Techniken zur LC-MS-Kopplung, da es die flüssige Phase der Chromatographie mit dem Hochvakuum des Massenspektrometers verbinden kann und die Analyten vergleichsweise weich ionisiert (Gross, 2013). Nach der Ionisierung gelangen die Ionen in das QqQ-Massenspektrometer. Zur „sensitiven und selektiven Quantifizierung“ wird der multiple reaction monitoring (MRM) Modus verwendet (Gey, 2008). Dabei wird im ersten Quadrupol die Ausgangsmasse des zu analysierenden Moleküls separiert, im zweiten Quadrupol erfolgt die Fragmentierung des Moleküls und im dritten Quadrupol wird die Masse des ausgewählten Fragmentmoleküls herausgefiltert (s. Abb. 6). Pro Analyt sind zwei

substanzspezifische Fragmentierungen auszuwählen und zur Quantifizierung bzw. Identifizierung des Analyten in der Probe zu analysieren (European Commission, 2002).

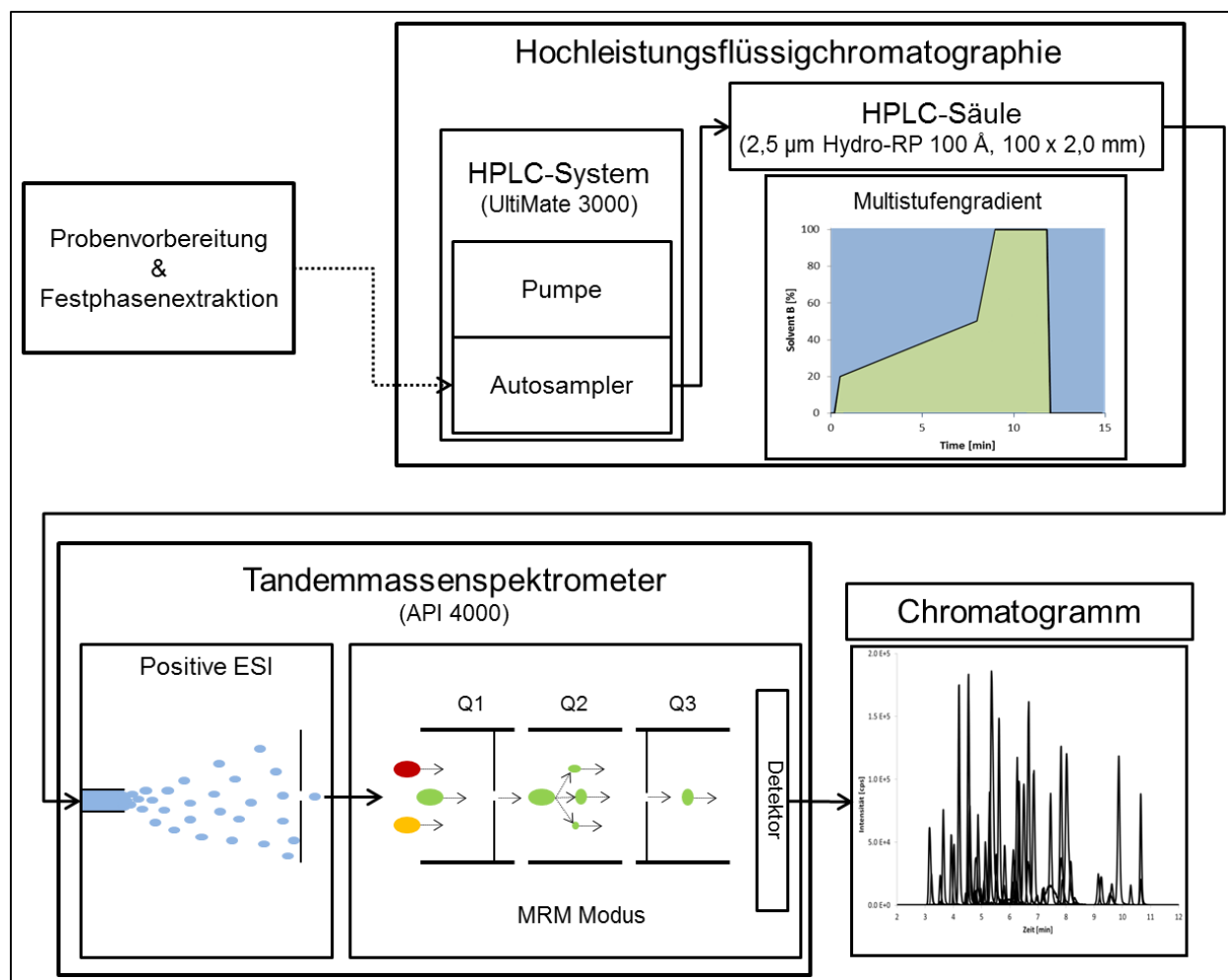


Abbildung 6: Grafische Darstellung der HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung sowie des Mehrstufengradienten und des MRM-Modus.

Für die HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen wurde ein Dionex-HPLC-System (UltiMate 3000 Pumpe und Autosampler, Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland), gekoppelt mit einem API 4000 Tandem-Massenspektrometer (Sciex, Framingham, MA, USA), verwendet. Als Injektionsvolumen wurden 20 µL gewählt und die Analyten über eine 2,5 µm Hydro-RP 100 Å, 100 x 2,0 mm Säule getrennt. Dafür wurde ein Mehrstufengradient verwendet (s. Abb 6). Die verwendeten Laufmittel A (97/3/0,05; v/v/v) und B (5/95/0,05; v/v/v) sind eine Mischung aus 2 mM Ammoniumacetat-Lösung, Acetonitril und Ameisensäure. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über die Verwendung von Internen Standards und einer Neun-Punkt-Kalibrationskurve in vierzigfach verdünntem Urin. Dies war notwendig, um die biologische Matrix so realitätsnah wie möglich zu simulieren, da keine Abwasserproben ohne

Arzneimittelbelastung zur Verfügung standen. Die Urinproben wurden dabei in der gleichen Art und Weise behandelt, wie es bereits für die Abwasserproben beschrieben wurde.

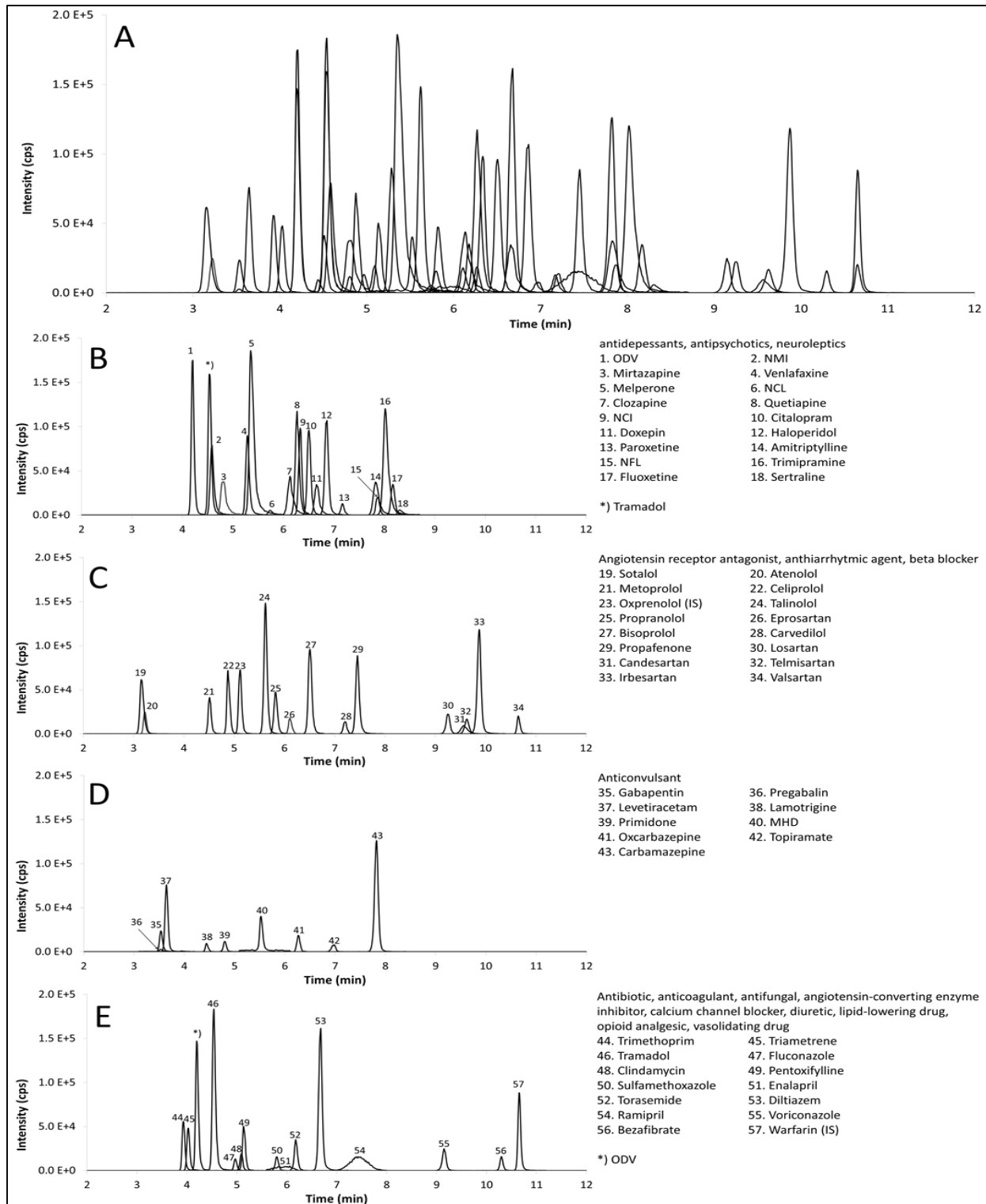


Abbildung 7: Chromatogramm der Analytauswahl (55 Analyten und zwei nicht-isotopenmarkierte IS - Oxprenolol & Warfarin), veröffentlicht in Gurke et al. (2015b).

Die entwickelte SPE-HPLC-ESI-MS/MS-Methode ermöglicht die Analyse und Quantifizierung von 56 Analyten unter Verwendung von 24 Internen Standards (davon 22 isotopenmarkierte Substanzen). Die Methode wurde für 55 Analyten anhand der Parameter Präzision, Wiederholpräzision, Reproduzierbarkeit, Matrixeffekt, Wiederfindung sowie dem unteren und oberen Quantifizierungslimit validiert (Gurke et al., 2015b). Die bestimmten unteren Quantifizierungslimits lagen zwischen 50 und 200 ng/L. Für alle Analyten, bis auf Norfluoxetin und Tramadol, konnten zwei MRM-Übergänge identifiziert und gemessen werden. Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm der Analyse (s. Abb. 7A) sowie eine Zuordnung der einzelnen Analyten zu den jeweiligen Signalen (s. Abb. 7B-E). Der Metabolit Clindamycin-Sulfoxid (CLS) wurde erst nachträglich in die Methode integriert.

3 Monitoring der Kläranlage Dresden-Kaditz

Das Abwasser der Kläranlage Dresden-Kaditz wurde an einzelnen Tagen im Mai und Juni 2014 sowie für einen zusammenhängenden Zeitraum von zehn Tagen im Januar 2015 untersucht. Die höchsten Konzentrationen während des zehntägigen Monitorings konnten im Zulauf der Kläranlage für Valsartan ($29,7 \pm 8,1 \mu\text{g/L}$), Levetiracetam ($12,5 \pm 3,2 \mu\text{g/L}$), Gabapentin ($13,2 \pm 3,3 \mu\text{g/L}$) und Metoprolol ($4,1 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$) gemessen werden. Der Vergleich der Konzentrationen im Zulauf der Kläranlage mit den Konzentrationen in den Proben, die nach der Vorklärung genommen wurden, zeigt, dass kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Im Ablauf der Kläranlage wurden die höchsten Konzentrationen für Valsartan ($22,1 \pm 5,1 \mu\text{g/L}$), Gabapentin ($12,1 \pm 2,6 \mu\text{g/L}$) und Metoprolol ($4,4 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$) gemessen. Einige Analyten, wie z. B. Fluoxetin, Haloperidol oder Trimipramin, konnten in den Abwasserproben nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt gut mit den Verschreibungsmengen dieser Arzneimittel überein, da sie nur in geringen Mengen in Dresden verbraucht werden.

Für die Kalkulation der Eliminierungsraten der Arzneimittel und Metaboliten während der Klärwerkspassage ist es notwendig, die Analytfrachten im Zu- und Ablauf der Kläranlage zu bestimmen. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse des zehntägigen Monitorings einschließlich der Frachten die nach der Vorklärung bestimmt wurden. Weiterhin sind die Ergebnisse der Stichproben aus Mai und Juni 2014 mit eingetragen und zeigen, dass für die meisten Analyten ähnliche Mengen gemessen werden konnten. Die ausgewählten Arzneimittel werden hauptsächlich in der Langzeitbehandlung von Erkrankungen eingesetzt und saisonale Unterschiede sind daher nicht zu erwarten. Dies konnte mit den Messungen bestätigt werden,

auch wenn weitere Messungen im Frühjahr, Sommer und Herbst für die Absicherung dieser Feststellung sinnvoll wären.

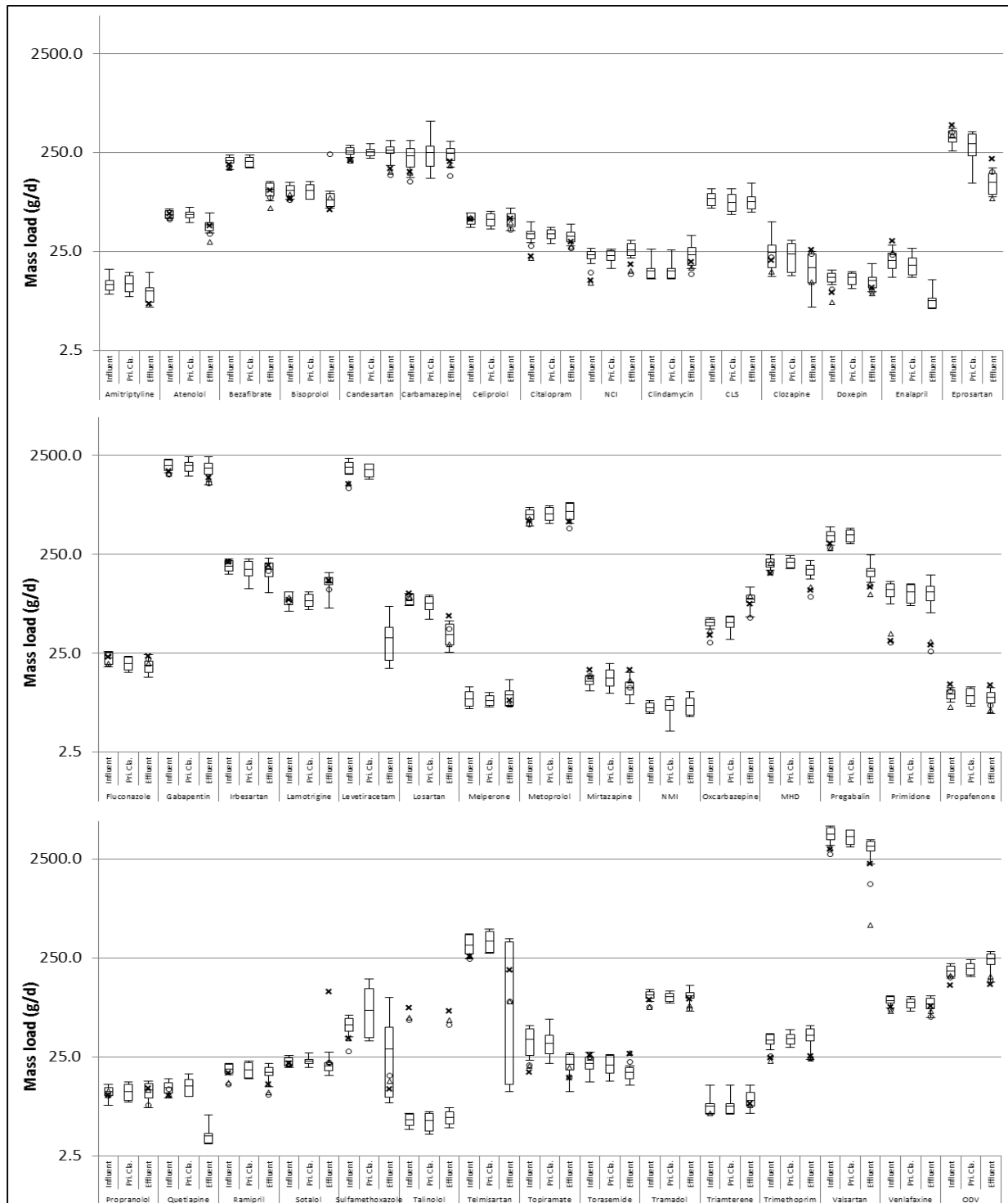


Abbildung 8: Gemessene Massenfrachten in Proben der verschiedenen Probenahmeorten (Zulauf [Influent], Vorklärung [Primary Clarifier], Ablauf [Effluent]). Die Boxplots stellen die Ergebnisse des zehntägigen Monitorings dar (Mittelwert, 25 %- und 75 %-Quantil, Maximum- und Minimumwerte). Die Symbole markieren Massefrachten, die im Mai/Juni 2014 gemessen wurden (x: 11. Mai; o: 01. Juni; Δ: 23. Juni), veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).

Der Vergleich der Ergebnisse des Monitorings im Januar 2015 mit den Ergebnissen der Stichproben aus Mai und Juni 2014 zeigen für Talinolol (Betablocker) und Primidon (Antikepileptikum) stärkere Differenzen. Für Talinolol kann dies durch einen starken Rückgang in der Verschreibungshäufigkeit erklärt werden. Für Primidon wurde ein ähnlicher Trend bei der Auswertung der Verschreibungsdaten (Zeitraum 2008 bis 2012) festgestellt. Da die Frachten in den Proben aus Mai/Juni 2014 geringer als im Januar 2015 waren, kann ein Rückgang der Verschreibungen keine Erklärung der Differenz sein. Vielmehr müssen andere Faktoren, wie z. B. die Temperatur, in Betracht gezogen werden. Diese Faktoren können z. B. einen Einfluss auf die Stabilität der Analyten im Abwasserkanalsystem haben.

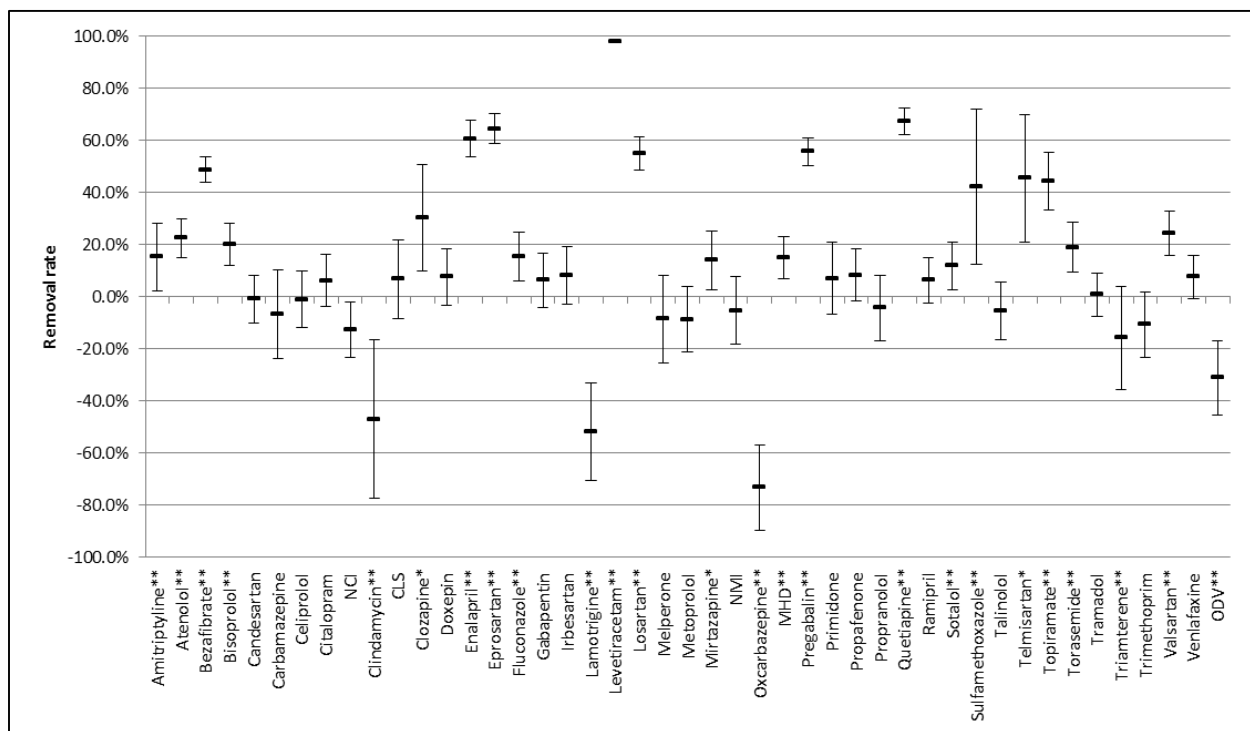


Abbildung 9: Eliminierungsraten und 90 % Konfidenzintervalle berechnet aus den gemessenen, mittleren Frachten des zehntägigen Monitorings im Zu- und Ablauf der Kläranlage Dresden-Kaditz. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: **p < 0,05, *p < 0,1, veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).

Die Berechnung der Eliminierungsraten war für 45 Analyten möglich (s. Abb. 8). Insgesamt zeigte die statistische Auswertung eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,1$) der Analytfrachten im Vergleich von Zu- und Ablauf für 20 der untersuchten Substanzen. Die höchste Eliminierungsrate (98,1 %) wurde dabei für Levetiracetam (Antiepileptikum) gemessen. Lediglich fünf weitere Arzneimittel zeigten eine Eliminierungsrate größer 50 % (Enalapril, Eprosartan, Losartan, Pregabalin, Quetiapin). Weitere 20 Analyten wurden ohne signifikanten Unterschied in Zu- und Ablauf gemessen. Für die Arzneimittel Oxcarbazepin, Lamotrigin,

Triamteren und Clindamycin sowie den Metaboliten ODV konnte im Ablauf eine signifikant höhere Fracht als im Zulauf festgestellt werden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte die Ausscheidung der Arzneimittel in glucuronidierter Form sein. Diese können im Abwasserbehandlungsprozess in die Ausgangsstoffe rücktransformiert werden (Verlicchi et al., 2012).

Neben den Arzneimitteln wurden sieben Metaboliten verschiedener Wirkstoffe im Rahmen der Untersuchungen analysiert. Hierbei konnten die höchsten Frachten für das 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepin (Monohydroxyderivat, MHD), den Hauptmetaboliten des Oxcarbazepin, sowie für ODV bestimmt werden. Für beide waren die Frachten an allen Beprobungspunkten höher als für die jeweilige Muttersubstanz. Dies gilt auch für Clindamycin und CLS, wobei Clindamycin nur im Ablauf der Kläranlage quantifizierbar war, CLS hingegen immer mit höheren Frachten bestimmt wurde. Auffällig ist auch, dass sich das Verhalten von Arzneimittel und dazugehörigem Metaboliten bei der Passage der Kläranlage unterscheiden kann. Während MHD die Kläranlage passiert und dabei im Ablauf mit einer signifikant geringeren Fracht messbar ist als im Zulauf, steigt der Anteil des Oxcarbazepins im Vergleich von Zu- und Ablauf stark an. Gleiches gilt für Venlafaxin und ODV, wobei hier jedoch der Metabolit mit höheren Frachten im Ab- als im Zulauf gemessen wurde und Venlafaxin ohne signifikante Elimination die Kläranlage passiert.

In Tabelle 2 sind die Exkretionsraten der Arzneimittel und der zugehörigen Metaboliten zusammengefasst. Unter der Annahme, dass glucuronidierte Formen des Arzneistoffes bzw. Metaboliten im Abwasser wieder in den jeweiligen Ausgangsstoff rücktransformiert werden können (Verlicchi et al., 2012), ergeben sich für die untersuchten Paare die im Rohabwasser² erwarteten Konzentrationsverhältnisse (s. Tab. 2). Die beste Übereinstimmung wurde für die erwarteten und gemessenen Verhältnisse von Citalopram und dessen Metaboliten NCI ermittelt. Der Vergleich zu den Ergebnissen anderer Studien zeigt, dass auch dort ähnliche Konzentrationsverhältnisse im Rohabwasser bestimmt werden konnten. Das erwartete Verhältnis zwischen Oxcarbazepin und MHD unterliegt einer großen Variabilität (2,8 – 119,1). Pharmakokinetische Studien mit Oxcarbazepin bei der Behandlung von Menschen haben gezeigt, dass dieser Wirkstoff und sein Metabolit MHD zu hohen Anteilen in glucuronidierter Form über den Urin ausgeschieden werden. Unter der Annahme, dass die glucuronidierten Formen im Abwasser vollständig gespalten werden, ergibt sich dann ein erwartetes Verhältnis von 7,4. Aus den hier bestimmten Konzentrationen berechnet sich ein Verhältnis von 4,7

² Als Rohabwasser wird unbehandeltes Abwasser bezeichnet, welches über das Abwasserkanalnetz zur Kläranlage gelangt.

zwischen der Ausgangssubstanz und dem Metaboliten. Dieser Wert liegt im unteren Bereich der erwarteten Werte (2,8 – 119,1), stimmt aber gut mit dem Verhältnis von 7,4 überein. Bisher publizierte Studien weichen z. T. sehr stark von diesem Verhältnis ab, liegen aber trotzdem innerhalb der erwarteten Schwankungsbreite. Für Venlafaxin/ODV und Mirtazapin/NMI konnten Konzentrationsverhältnisse im Abwasser bestimmt werden, die sehr gut mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmen, jedoch jeweils unterhalb des erwarteten Verhältnisses liegen.

Tabelle 2: Exkretionsraten der Arzneimittel und der dazugehörigen Metaboliten sowie erwartetes und gemessenes Verhältnis dieser im Rohabwasser, veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).

Pharmaceutical (PH)/ corresponding metabolite (CM)	Excretion (Exc) in non-conjugated and conjugated form				Ref.	Ratio (CM/PH) in raw sewage	
	PH	conj.- PH	CM	conj.- CM		Expected ³	Measured ⁴ (ref.)
Citalopram/ N-desmethyl citalopram ¹	26 %	12 %	19 %	0 %	A	0.5-0.7	0.6 & 0.8 (J) 0.6 (K) 0.6 [this study]
Clozapine/ N-desmethyl clozapine ²	2.5 %	3.1 %	1.3- 5.3 %	0 %	B,C,D	0.2-2.0	- ⁵
Mirtazapine/ N-desmethyl mirtazapine ¹	4 %	25 %	25- 35 %	0%	E,F	0.8-8.3	0.3 (L) 0.5 [this study]
Oxcarbazepine/ 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine ¹	0.6 %	9 %	26.9 %	41.1- 44.0 %	G,H	2.8-119.1	4.7 (K) 37.0 (M), 2.2 (N) 4.7 [this study]
Venlafaxine/ O-desmethyl venlafaxine ¹	4.7 %	0 %	29.4 %	26.4 %	I	5.9-11.3	2.3 & 2.0 (J) 2.0 (K), 2.0 (L) 5.8, 5.9 & 2.9 (O) 2.0 [this study]

¹ Urin

² Urin + Fäzes

³ $(CM/PH)_{exp} = (M_{CM} \cdot Exc_{CM}) / (M_{PH} \cdot Exc_{PH})$

⁴ $(CM/PH)_{meas} = C_{CM} / C_{PH}$

⁵ Es konnte keine Studie gefunden werden, in der Clozapin und N-Desmethyloclapin (NCL) bestimmt wurden; NCL konnte in dieser Studie nicht quantifiziert werden und eine Berechnung des CM/PH Verhältnisses war somit nicht möglich.

Referenzliste: A) Dalgaard und Larsen (1999), B) Dain et al. (1997), C) Sheehan et al. (2010), D) Schaber et al. (1998), E) Szegedi und Schwertfeger (2005), F) Timmer et al. (2000), G) Schütz et al. (1986), H) Flesch et al. (2011), I) Howell et al. (1993), J) Metcalfe et al. (2010), K) Gurke et al. (2015), L) Lajeunesse et al. (2012), M) Kaiser et al. (2014), N) Leclercq et al. (2009), O) Rúa-Gómez und Püttmann (2012).

4 Diskussion

Bei ca. 2 300 zugelassenen Wirkstoffen ist die Eingrenzung der möglichen Zielmoleküle basierend auf regionalen Verschreibungsdaten ein geeignetes Mittel, um zeit- und kostensparend Arzneimittel mit großen Eintragsmengen in das Abwasser auszuwählen und auf dieser Auswahl beruhend eine Analytikmethode zu entwickeln. Dies konnte für das Einzugsgebiet der Kläranlage Dresden-Kaditz unter Verwendung der Verschreibungsdaten für rezeptpflichtige Arzneimittel, bereitgestellt durch die AOK PLUS, erfolgreich durchgeführt werden. Neben der Berücksichtigung der Verschreibungsmengen ist es für eine akkurate Vorhersage der Eintragsmengen in das Abwassersystem auch notwendig, den Metabolismus der Arzneimittel einzubeziehen, denn die Ausscheidung des unveränderten Arzneimittels ist substanzabhängig und kann sich von 0 bis 100 % erstrecken. Dies gilt auch für die Metaboliten der Arzneimittel, die in die Untersuchungen mit einbezogen werden müssen. Die Beispiele Oxcarbazepin/MHD und Venlafaxin/ODV zeigen, dass die Konzentration der Metaboliten die des Ausgangsstoffes im Abwasser übersteigen kann. Die Auswertung pharmakokinetischer Daten von Studien am Menschen hat verdeutlicht, dass hier oftmals nur unzureichende Daten bezüglich Metabolismus und Exkretion vorliegen. Diese lassen zumeist nur eine semiquantitative Bestimmung der Ausscheidungsmenge der Arzneimittel zu, da vor allem auch der Anteil, der über die Fäzes ausgeschieden wird, häufig nicht erfasst wurde. Die Hauptmetaboliten der Wirkstoffe sind für die meisten Substanzen bestimmt, eine genaue Untersuchung der Anteile, die zu diesem Metaboliten umgesetzt werden, ist jedoch häufig nicht zu finden oder die angegebenen Werte schwanken von Studie zu Studie sehr stark. Es kommt hinzu, dass viele Wirkstoffe, wie z. B. Mirtazapin (Szegedi und Schwertfeger, 2005) oder Oxcarbazepin (Flesch et al., 2011), ein chirales oder prochirales Zentrum besitzen. Die Enantiomere können sich im humanen Metabolismus unterschiedlich verhalten. Dieser Umstand findet jedoch für die meisten Arzneimittel und die zugehörigen Pharmakokinetikstudien keine Berücksichtigung oder wird nur unzureichend untersucht. Dies gilt auch für die Untersuchung des Verhaltens der chiralen Arzneimittel und Metaboliten während des Abwasserbehandlungsprozesses. Es gibt erste Studien, die diesen Umstand berücksichtigen, hier müssen jedoch noch wesentlich mehr Forschungsanstrengungen unternommen werden (Kasprzyk-Hordern, 2010).

Basierend auf der Vorauswahl der Analyten konnte eine SPE-HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Untersuchung von Arzneimitteln aus verschiedenen Wirkstoffklassen unter Berücksichtigung einiger Metaboliten entwickelt und validiert werden. Im Zuge der verwendeten Umkehrphasen-

Chromatographie sowie positiver Elektrosprayionisation erfolgte der zweckdienliche Ausschluss von Analyten, welche mit diesen Methoden nicht analysiert werden können. Für Arzneimittel, die mit der hier beschriebenen Methode nicht zugänglich sind, müssen zusätzliche Methoden entwickelt und Bestimmungen der Frachten im Abwasser durchgeführt werden. Ein prominentes Beispiel ist Metformin, ein Antidiabetikum, welches mengenmäßig das mit Abstand meistverschriebene Arzneimittel im Einzugsgebiet der Kläranlage Dresden-Kaditz darstellt. Da es aber mit RP-Chromatographie nicht analysierbar ist, konnte es in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt werden. Die Verwendung der HILIC könnte dieses Problem lösen. Weitere Arzneimittel mit hohen Verschreibungsmengen, die in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollten, sind z. B. Metamizol (Nichtopioides-Analgetikum), Piracetam (Antidementivum) oder Valproinsäure (Antiepileptikum).

Studien von Majewski et al. (2011) und Ort et al. (2010) haben gezeigt, dass eine Berechnung der Eliminierungsraten auf Grundlage von Stichproben oder einzelnen Mischproben des Zu- und Ablaufs der Kläranlage nicht möglich ist oder zumindest eine hohe Fehleranfälligkeit besitzt. Der hier gewählte Ansatz, die Kläranlage über zehn zusammenhängende Tage zu beproben, verspricht zuverlässige Resultate bzgl. der Eliminierungsraten der ausgewählten Analyten. Wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben (Verlicchi et al., 2012; Luo et al., 2014; Petrie et al., 2014), zeigen auch die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die Eliminierung der Analyten stoffabhängig ist und stark variiert. Lediglich fünf von 45 Analyten, für die die Berechnung der Eliminierungsrate durchgeführt werden konnte, werden mit einer Rate größer 50 % aus dem Abwasser entfernt. Für die anderen 40 Substanzen ist davon auszugehen, dass ein wesentlicher Anteil der Fracht die Kläranlage passiert und in die Umwelt gelangt. Bedenklich ist weiterhin, dass für einige Analyten eine signifikant höhere Fracht im Ablauf als im Zulauf zu detektieren ist. Für Oxcarbazepin, Lamotrigin und ODV könnte dies dadurch erklärt werden, dass diese Substanzen im menschlichen Körper glucuronidiert werden (Schütz et al., 1986; Howell et al., 1993; Rouan et al., 1994; Garnett, 1997) und als Glucuronid in das Abwasser gelangen. Glucuronide können im Verlauf der Abwasserbehandlung in die Ausgangsstoffe rücktransformiert werden (Verlicchi et al., 2012).

Auch wenn bei der Einleitung des Abwassers in Oberflächengewässer eine wesentliche Verdünnung zu erwarten ist, so bleibt dennoch zu konstatieren, dass für einzelne Analyten, wie z. B. Valsartan, Gabapentin und Metoprolol, Konzentrationen im hohen Nanogramm pro Liter Bereich im Oberflächengewässer zu erwarten sind. Rückstände einiger Arzneimittel konnten bereits im Grund- und Trinkwasser detektiert werden (Vulliet und Cren-Olivé, 2011; López-Serna et al., 2013; Mompelat et al., 2009; Valcárcel et al., 2011) und es ist anzunehmen, dass diese

Kontaminationen aus dem Oberflächenwasser stammen. Es ist notwendig, die potentielle ökotoxikologische Wirkung der Arzneimittel und Metaboliten in der aquatischen Umwelt genauer zu bewerten und zu prüfen, ob eine Erweiterung der Kläranlagen mit einer vierten Reinigungsstufe nach dem Vorbild der Schweiz notwendig ist.

5 Fazit

Der Verbrauch von Arzneimitteln ist in den vergangenen Jahren immer weiter angestiegen und es ist aufgrund des demografischen Wandels davon auszugehen, dass die Verschreibungsmengen in den kommenden Jahren weiter zunehmen werden. Die Arzneimittel werden nach der Einnahme über Urin und Fäzes in das Abwassersystem eingeleitet und gelangen zur Kläranlage. Bei der Abwasserbehandlung werden die meisten Arzneimittel nur unzureichend zurückgehalten und nur einige wenige können vollständig aus der wässrigen Phase eliminiert werden. Dabei ist aus den hier vorliegenden Ergebnissen nicht ersichtlich, ob die Substanzen während der Behandlung abgebaut werden oder an den Klärschlamm adsorbieren und die Kläranlage mit diesem verlassen. Hier sind weitere Untersuchungen für die ausgewählten Substanzen notwendig. Für die Analyten, die im Verlauf der Abwasserbehandlung freigesetzt werden, bleibt abschließend nachzuweisen, ob dies wirklich aufgrund der Rücktransformation aus Glucuroniden erfolgt oder ob sie z. B. im Zulauf an Partikel adsorbiert vorliegen und erst in der Kläranlage von diesen desorbieren.

Es erfolgt ein permanenter Eintrag von Arzneimitteln und deren Metaboliten über den Kläranlagenablauf in die Oberflächengewässer. Die Auswirkungen dieser Arzneimittel auf die aquatische Umwelt müssen intensiver untersucht werden. Auch wenn die Konzentrationen weit unter den therapeutischen Konzentrationen liegen, wie sie zur Behandlung von Menschen notwendig sind, so zeigen Studien, dass z. B. der Eintrag von östrogenhaltigen Verbindungen zu Reproduktionsfehlern bei Fischen führen kann. Im Sinne des vorsorgenden Umweltschutzes sind derartige Kontaminationen der Umwelt zu vermeiden oder wenigstens zu verringern.

Derzeit werden verschiedene Ansätze diskutiert, wie der Eintrag von Arzneimitteln und Arzneimittelmetaboliten über die Kläranlagen in die Umwelt verhindert, wenigstens aber minimiert werden kann. Eine Möglichkeit ist der Einsatz einer vierten Reinigungsstufe in den Kläranlagen. Die Schweiz zeigt, dass dies mit breiter Unterstützung durch die Bevölkerung umgesetzt werden kann. Zur Verbesserung der Wasserqualität sollen hier große und mittlere Kläranlagen mit einer vierten Reinigungsstufe ausgestattet werden (Umweltbundesamt, 2015). Für Deutschland ist eine derartige Veränderung der Abwasserbehandlung noch nicht absehbar und die Notwendigkeit der Aufrüstung der Kläranlagen wird gegenwärtig noch diskutiert. Brandmayr et al. (2015) konnten an den Beispielen Metoprolol (Betablocker) und Metformin (Antidiabetikum) zeigen, dass neben der Verbesserung der Abwasserreinigung auch weitere Faktoren den Eintrag von Arzneimitteln in die Umwelt verringern können. Vor allem die Stärkung der Krankheitsvorsorge sowie die Substitution von Wirkstoffen durch weniger ökotoxikologische

oder besser abbaubare Arzneimittel zeigten sich als sinnvolle Handlungsstrategien. Daneben führten sie auch auf, dass zukünftig die Entwicklung von besser umweltverträglichen Substanzen einen wesentlichen Beitrag dazu leisten kann, die Belastung der Umwelt durch Arzneimittel zu verringern. In neuesten Projekten, wie z. B. in der Gruppe von Kümmerer (Leuphana Universität Lüneburg), wird daran geforscht, wie die Struktur von Arzneimitteln verändert werden muss, damit die Abbaubarkeit steigt. An dieser Stelle ist auch zu erwähnen, dass Arzneimittel seit 2004 im Zulassungsprozess einer Umweltrisikobewertung unterzogen werden müssen. Allerdings steht das Patientenwohl im Vordergrund und eine negative Umweltrisikobewertung führt nicht dazu, dass das Arzneimittel für den Humangebrauch nicht zugelassen wird, denn die Bewertung geht nicht in die Nutzen-Risiko-Abwägung ein. Gleiches gilt für Arzneimittel, die vor 2004 zugelassen wurden. Hier muss ein sinnvoller Kompromiss gefunden werden, der das Patientenwohl berücksichtigt, ein potentielles Umweltrisiko aber dennoch nicht komplett vernachlässigt. Dazu müssen in Zukunft die ökotoxikologischen Auswirkungen der Arzneimittel, Arzneimittelmetaboliten sowie deren Mischungen auf die aquatische Umwelt noch intensiver untersucht und bewertet werden. Hier besteht noch dringender Forschungsbedarf.

6 Zusammenfassung

Humanarzneimittel sind ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin und die jährlichen Verschreibungsmengen in Deutschland steigen stetig an. Nach der Einnahme wird das Arzneimittel im menschlichen Körper je nach Substanz unterschiedlich stark verstoffwechselt und teilweise unverändert, teilweise metabolisiert über Urin und Fäzes wieder ausgeschieden. Bereits 1977 gelang der erste positive Nachweis von Arzneimittelmetaboliten im Abwasser. Seitdem haben zahlreiche Studien diesen Sachverhalt untersucht und eine Vielzahl unterschiedlichster Arzneimittel aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen sowie einige ihrer Metaboliten im Abwasser detektiert. Die Studien zeigen auch, dass die moderne Abwasserbehandlungstechnik nicht dafür geeignet ist, diese Rückstände aus dem Abwasser zu entfernen. Mit dem behandelten Abwasser verlassen die Arzneimittel und Metaboliten die Kläranlage, gelangen von dort in die Oberflächengewässer und konnten sogar im Grund- und vereinzelt auch im Trinkwasser nachgewiesen werden. Einige Untersuchungen belegen, dass es zu negativen Auswirkungen für die aquatische Umwelt kommen kann. So verursacht z. B. der Eintrag von Ethinylestradiol in die aquatische Umwelt Reproduktionsfehler bei Fischen.

In Deutschland sind ca. 2 300 Wirkstoffe für den Einsatz in der Humanmedizin zugelassen. Zur Minimierung von Zeit- und Kostenaufwand ist eine Identifikation relevanter Arzneimittel mit hohen Verschreibungsmengen vor der Entwicklung einer Analysenmethode und der Durchführung eines Monitorings unumgänglich. Dies wurde anhand der von der Krankenkasse AOK PLUS zur Verfügung gestellten Verschreibungsdaten für das Einzugsgebiet der Kläranlage Dresden-Kaditz durchgeführt. Nach Möglichkeit sollten außerdem relevante Metaboliten identifiziert und ebenfalls in die Analyse integriert werden. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation relevanter Arzneimittel und Metaboliten, die Entwicklung geeigneter Methoden zur Analyse und der Nachweis dieser Rückstände im Abwasser der Stadt Dresden sowie die Bestimmung der Mengen, die über die Kläranlage Dresden-Kaditz in die Elbe entlassen werden. Die Analytik von Abwasserproben mit der Zielstellung der Quantifizierung von Arzneimittelrückständen erfolgt nahezu ausschließlich über die Verwendung von Festphasenextraktion (SPE), Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) unter Anwendung der Elektrosprayionisation (ESI). Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer geeigneten SPE-HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Analyse möglichst vieler Analyten in Abwasserproben mittels einer Analysenmethode.

Insgesamt konnte eine Untersuchungsmethode für die Analyse von 56 Analyten (49 Arzneimittel und sieben Metaboliten) unter Verwendung von 24 Internen Standards (davon

22 isotoopenmarkierte Substanzen) entwickelt und validiert werden. Die Methode wurde erfolgreich zur Untersuchung von Abwasserproben aus der Kläranlage Dresden-Kaditz eingesetzt. Es wurde ein Monitoring über zehn zusammenhängende Tage durchgeführt. Im Zulauf der Kläranlage konnten die höchsten Konzentrationen für Valsartan ($29,7 \pm 8,1 \mu\text{g/L}$), Levetiracetam ($12,5 \pm 3,2 \mu\text{g/L}$), Gabapentin ($13,2 \pm 3,3 \mu\text{g/L}$) und Metoprolol ($4,1 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$) gemessen werden. Im Ablauf der Kläranlage wurden die höchsten Konzentrationen für Valsartan ($22,1 \pm 5,1 \mu\text{g/L}$), Gabapentin ($12,1 \pm 2,6 \mu\text{g/L}$) und Metoprolol ($4,4 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$) bestimmt. Um festzustellen, wie effektiv die Kläranlage Arzneimittelrückstände aus dem Abwasser entfernt, wurden die mittleren täglichen Frachten von Zu- und Ablauf, die im zehntägigen Monitoringprogramm bestimmt werden konnten, verglichen. Als Grundlage für die Berechnungen dienten die Ergebnisse des zehntägigen Monitoringprogramms. Wie bereits vielfach festgestellt werden konnte, sind Kläranlagen nicht dafür konzipiert worden, derartige Verunreinigungen aus dem Abwasser zu entfernen. Lediglich fünf von 45 Analyten werden mit einer Eliminierungsrate größer 50 % aus dem Abwasser entfernt und nur für Levetiracetam (Antiepileptikum) konnte mit 98,1 % eine nahezu vollständige Elimination aus dem Abwasser festgestellt werden. Für die anderen 40 Substanzen zeigen die Untersuchungen, dass ein wesentlicher Anteil der Fracht die Kläranlage passiert und in die Umwelt gelangt. Dabei verdeutlichen die Beispiele des O-Desmethylvenlafaxins (ODV, Hauptmetabolit des Venlafaxin) und 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepins (MHD, Hauptmetabolit des Oxcarbazepin), wie wichtig es ist, den Metabolismus der Arzneimittel zu berücksichtigen. Beide Metaboliten konnten in allen Messungen mit höheren Konzentrationen als ihre Muttersubstanzen detektiert werden. Dabei ist außerdem festzuhalten, dass sich trotz struktureller Ähnlichkeit Muttersubstanz und Metabolit im Abwasserbehandlungsprozess sehr unterschiedlich verhalten können. Während MHD und Venlafaxin im Vergleich von Zu- und Ablauf eine geringfügige Verringerung der Fracht zeigen, so sind die Werte für Oxcarbazepin und ODV im Ablauf signifikant höher als im Zulauf. Eine Freisetzung der Analyten kann z. B. durch die Rücktransformation der Substanz aus einer glucuronidierten Form resultieren. Eine Ausscheidung als Glucuronid ist sowohl für Oxcarbazepin als auch für ODV bewiesen und die Möglichkeit der Rücktransformation ist aus früheren Studien bekannt.

Kläranlagen sind nicht dafür geeignet, Arzneimittel- und Metabolitenrückstände vollständig aus dem Abwasser zu entfernen. Vielmehr gelangt ein Großteil der Rückstände in die aquatische Umwelt. Auch wenn die gefundenen Konzentrationen weit unter den therapeutischen Konzentrationen liegen, wie sie zur Behandlung von Menschen notwendig sind, so wird doch klar, dass im Sinne des vorsorgenden Umweltschutzes der Eintrag von Arzneimitteln in die

Umwelt zu verhindern, wenigstens aber zu minimieren ist. Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten, wie z. B. die Erweiterung der Kläranlagen um eine vierte Reinigungsstufe oder die Substitution von Arzneimitteln durch besser abbaubare Verbindungen, zur Verfügung. Gegenwärtig wird noch diskutiert, welche Wege zu beschreiten sind. Vermutlich wird sich die Problematik aber nur durch einen gesamtheitlichen Ansatz mit der Kombination verschiedenster Verbesserungsmöglichkeiten lösen lassen.

7 Summary

Human medicines are an essential part of modern medicine and the number of annual prescriptions are increasing in Germany. After consumption, pharmaceuticals are metabolized differently depending on the substance and are excreted via urine and faeces partly non-metabolized, partly metabolized. Early studies conducted in 1977 were able to detect pharmaceutical residues in sewage. Since then, numerous studies have investigated this topic and several pharmaceuticals have been detected. The investigations show also, that the modern sewage treatment plants are not constructed for the removal of such residues from sewage. The pharmaceuticals and their metabolites are discharged from the sewage treatment plant together with the wastewater and are released into surface waters and are even detectable in ground and drinking water. Some studies clearly show adverse effects caused by pharmaceuticals in the aquatic environment, for example ethynylestradiol may cause reproductive failure in fish.

In Germany around 2 300 active compounds are approved for human use. To reduce costs and save time it's necessary to identify relevant pharmaceuticals with high prescription amounts before starting the development of an analytical method for the detection in sewage or conducting a monitoring in a sewage treatment plant (STP). This was done for the catchment area of the STP Dresden-Kaditz by evaluating the prescription data provided by the health insurance company AOK PLUS. Furthermore, relevant metabolites should be identified and also be considered for the analysis. The aim of this study was to identify relevant pharmaceuticals and metabolites, to develop a suitable analytical method, to detect the pharmaceutical residues in the sewage of the city Dresden and to determine the amount discharged from the STP Dresden-Kaditz into the river Elbe. Most of the analysis to detect pharmaceutical residues in sewage is done using a combination of solid phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometry (MS/MS) in combination with electrospray ionization (ESI). The objective of this research was the development of a suitable SPE-HPLC-ESI-MS/MS-method for the analysis of a wide range of pharmaceuticals in sewage by using only one method.

A method for the detection and quantification of 56 analytes (49 pharmaceuticals and seven metabolites) using 24 internal standards (22 of them isotopically labelled) was developed and validated. The method was successfully used for the investigation of sewage samples taken in the STP Dresden-Kaditz. A monitoring period of ten consecutive days was conducted. The highest concentrations in the influent were determined for valsartan ($29.7 \pm 8.1 \mu\text{g/L}$), levetiracetam ($12.5 \pm 3.2 \mu\text{g/L}$), gabapentin ($13.2 \pm 3.3 \mu\text{g/L}$), and metoprolol ($4.1 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$). In

the effluent, the highest concentrations were measured for valsartan ($22.1 \pm 5.1 \mu\text{g/L}$), gabapentin ($12.1 \pm 2.6 \mu\text{g/L}$), and metoprolol ($4.4 \pm 0.9 \mu\text{g/L}$). To determine the removal rates for the sewage treatment process in the STP, mean daily mass loads of influent and effluent determined in the ten days monitoring period were compared. The results suggest that this STP is not capable of efficiently removing pharmaceutical residues from sewage. When compared to results found in the current literature, this trend has been commonly observed in several international studies. The calculation of removal rates was possible for 45 of the selected compounds. Only five of 45 analytes were removed from the sewage with a rate higher than 50 % and only for levetiracetam a nearly complete removal (98.1%) was observed. In case of the other 40 substances a major part of the mass load is going through the STP and is released into the environment. The examples of O-desmethyl venlafaxine (ODV, main metabolite of venlafaxine) and 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (MHD, main metabolite of oxcarbazepine) demonstrate the importance of considering the metabolism of pharmaceuticals in such investigations. Both metabolites were detected in all measurements with higher concentrations than their parent substances. Furthermore, it has to be noted that despite the structural similarity between parent compound and metabolite, the behaviour in the sewage treatment process can differ extremely. While the mass load of MHD and venlafaxine decreased slightly when comparing influent and effluent, the values for oxcarbazepine and ODV are significantly higher in the effluent than in the influent. A release of the residue can be due to the back transformation of a glucuronidated form into the original substance. The excretion as glucuronide was shown for oxcarbazepine and also for ODV and the possibility of a back transformation in sewage is known from former studies.

Sewage treatment plants are not able to completely remove pharmaceutical residues from sewage. In fact, the majority of the residues are discharged into the aquatic environment through treated effluent. Even though the determined concentrations are below the therapeutic concentrations required for the treatment of a human, it is obvious that in the interest of environmental health it is necessary to reduce the release of pharmaceuticals into the aquatic environment. The discharge of pharmaceuticals and their metabolites into aquatic systems may be mitigated through the implementation of improved treatment technologies such as advanced tertiary treatment before effluent discharge. Furthermore, the replacement of pharmaceuticals with high ecotoxicological potential by better degradable substances is another possibility. Probably the final solution for this problem will be a comprehensive approach combining different improvement opportunities.

8 Literaturverzeichnis

- Brandmayr C, Kerber H, Winker M, Schramm E. 2015. Impact assessment of emission management strategies of the pharmaceuticals Metformin and Metoprolol to the aquatic environment using Bayesian networks. *Sci Total Environ* 532:605–616.
- Dain JG, Nicoletti J, Ballard F. 1997. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab Dispos* 25:603–609.
- Dalgaard L, Larsen C. 1999. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acetyl- and N-glucuronides. *Xenobiotica* 29:1033–1041.
- European Commission. 2002. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities* 221:8–36.
- Ferrer I, Thurman EM. 2013. Analysis of Pharmaceuticals in Drinking Water, Groundwater, Surface Water, and Wastewater. *Compr Anal Chem* 62:91–128.
- Flesch G, Czendlik C, Renard D, Lloyd P. 2011. Pharmacokinetics of the monohydroxy derivative of oxcarbazepine and its enantiomers after a single intravenous dose given as racemate compared with a single oral dose of oxcarbazepine. *Drug Metab Dispos* 39:1103–1110.
- Garnett WR. 1997. Lamotrigine: Pharmacokinetics. *J Child Neurol* 12:10–15.
- Gey MH. 2008. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. 2. erw. Aufl. Springer, Berlin.
- Gonzalez FJ, Tukey RH. 2006. Drug Metabolism. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Hrsg.). Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. Aufl. McGraw-Hill, New York, S. 71–91.
- Gross JH. 2013. Massenspektrometrie. Springer, Berlin.
- Gurke R, Rößler M, Marx C, Diamond S, Schubert S, Oertel R, Fauler J. 2015a. Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. *Sci Total Environ* 532:762–770.
- Gurke R, Rossmann J, Schubert S, Sandmann T, Rößler M, Oertel R, Fauler J. 2015b. Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. *J Chromatogr B* 990:23–30.

- Heberer T, Butz S, Stan H-J. 1995. Analysis of Phenoxycarboxylic Acids and Other Acidic Compounds in Tap, Ground, Surface and Sewage Water at the Low ng/l Level. *Int J Environ Anal Chem* 58:43–53.
- Hignite C, Azarnoff DL. 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* 20:337–341.
- Howell SR, Husbands GE, Scatina JA, Sisenwine SF. 1993. Metabolic disposition of ¹⁴C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica* 23:349–359.
- Kaiser E, Prasse C, Wagner M, Bröder K, Ternes TA. 2014. Transformation of oxcarbazepine and human metabolites of carbamazepine and oxcarbazepine in wastewater treatment and sand filters. *Environ Sci Technol* 48:10208–10216.
- Kasprzyk-Hordern B. 2010. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem Soc Rev* 39:4466–4503.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 42:3498–3518.
- Ketter TA, Frye MA, Corá-Locatelli G, Kimbrell TA, Post RM. 1999. Metabolism and Excretion of Mood Stabilizers and New Anticonvulsants. *Cell Mol Neurobiol* 19:511–532.
- Kostich MS, Lazorchak JM. 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci Total Environ* 389:329–339.
- Kümmerer K, Henninger A. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin Microbiol Infect* 9:1203–1214.
- Lajeunesse A, Smyth SA, Barclay K, Sauvé S, Gagnon C. 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res* 46:5600–5612.
- Leclercq M, Mathieu O, Gomez E, Casellas C, Fenet H, Hillaire-Buys D. 2009. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol* 56:408–415.
- López-Serna R, Jurado A, Vázquez-Suñé E, Carrera J, Petrovic M, Barceló D. 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environ Pollut* 174:305–315.
- Lucke N. 2014. Kanalsystem und Kläranlagen der Stadt Dresden. *Prävention und Gesundheitsförderung* 9:218–222.

- Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XC. 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ* 473-474:619–641.
- Majewsky M, Gallé T, Bayerle M, Goel R, Fischer K, Vanrolleghem PA. 2011. Xenobiotic removal efficiencies in wastewater treatment plants: residence time distributions as a guiding principle for sampling strategies. *Water Res* 45:6152–6162.
- Marx C, Mühlbauer V, Schubert S, Oertel R, Ahnert M, Krebs P, Kuehn V. 2015. Representative input load of antibiotics to WWTPs: Predictive accuracy and determination of a required sampling quantity. *Water Res* 76:19–32.
- Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ Toxicol Chem* 29:79–89.
- Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem* 22:2872–2880.
- Mompelat S, Bot B Le, Thomas O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ Int* 35:803–814.
- Nash JP, Kime DE, Ven LTM Van der, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR. 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ Health Perspect* 112:1725–1733.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427:630–633.
- Oosterhuis M, Sacher F, ter Laak TL. 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci Total Environ* 442:380–388.
- Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A. 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol* 44:6024–6035.
- Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res* 49:145-159.

- Petrovic M. 2014. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends Environ Anal Chem* 1:e25–e33.
- Rossmann J, Schubert S, Gurke R, Oertel R, Kirch W. 2014. Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE–LC–MS/MS. *J Chromatogr B* 969:162–170.
- Rouan MC, Lecaillon JB, Godbillon J, Menard F, Darragon T, Meyer P, Jungers P, Kourilsky O, Hillion D, Aldigier JC. 1994. The effect of renal impairment on the pharmacokinetics of oxcarbazepine and its metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 47:161–167.
- Rúa-Gómez PC, Püttmann W. 2012. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. *Environ Sci Pollut Res Int* 19:689–699.
- Schaber G, Stevens I, Gaertner HJ, Dietz K, Breyer-Pfaff U. 1998. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br J Clin Pharmacol* 46:453–459.
- Schütz H, Feldmann KF, Faigle JW, Kriemler H-P, Winkler T. 1986. The metabolism of ¹⁴C-oxcarbazepine in man. *Xenobiotica* 16:769–778.
- Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). 2014. *Arzneiverordnungs- Report 2014*. Springer, Berlin.
- Sheehan JJ, Sliwa JK, Amatniek JC, Grinspan A, Canuso CM. 2010. Atypical antipsychotic metabolism and excretion. *Curr Drug Metab* 11:516–525.
- Szegedi A, Schwertfeger N. 2005. Mirtazapine: a review of its clinical efficacy and tolerability. *Expert Opin Pharmacother* 6:631–641.
- Ternes TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 32:3245–3260.
- Timmer CJ, Sitsen JM, Delbressine LP. 2000. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin Pharmacokinet* 38:461–474.
- Timpel P, Gurke R, Marx C, Knoth H, Fauler J. Antibiotikaeintrag in das urbane Abwasser Eine sekundärdatenbasierte Analyse zur Eintragsabschätzung am Beispiel der Stadt Dresden. *Bundesgesundheitsblatt* (im Druck).
- Umweltbundesamt (Hrsg.). 2014. *Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen*. Dessau-Roßlau.
- Umweltbundesamt (Hrsg.). 2015. *Mikroverunreinigungen und Abwasserabgabe*. Dessau-Roßlau.

- Valcárcel Y, González Alonso S, Rodríguez-Gil JL, Gil A, Catalá M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 84:1336–1348.
- Verlicchi P, Aukidy M Al, Zambello E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - A review. *Sci Total Environ* 429:123–155.
- Vulliet E, Cren-Olivé C. 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut* 159:2929–2934.
- Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke H, Schmidt R, Stachel B, von Tümpling W, Wanke A. 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57:107–126.

9 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme, Angiotensin-Konversionsenzym
ATC	Anatomisch-therapeutisch-chemischen Klassifikationssystems
CLS	Clindamycin-Sulfoxid
DDD	defined daily dose, Definierte Tagesdosis
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrosprayionisation
GC	Gaschromatographie
Gluc-ODV	Glucuronidiertes O-Desmethylvenlafaxin
HILIC	hydrophilic interaction chromatography, Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
IS	Interner Standard
LC	liquid chromatography, Flüssigchromatographie
MHD	Monohydroxyderivat, 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepin
MRM	multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NCL	N-Desmethylozapin
NCI	N-Desmethylopram
NDV	N-Desmethylvenlafaxin
NFL	Norfluoxetin
NMI	N-Desmethyloirzapin
Na ₂ EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
ODV	O-Desmethylvenlafaxin
QqQ	Triple-Quadrupol
RP	reversed phase, Umkehrphase
SPE	solid phase extraction, Festphasenextraktion

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Arzneimittel und Metaboliten (CLS: Clindamycin-Sulfoxid, MHD: 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepin, NCL: N-Desmethylozapin, NCI: N-Desmethyloitalopram, NFL: Norfluoxetin, NMI: N-Desmethyloirtazapin, ODV: O-Desmethyloenlafaxin), entnommen aus Gurke et al. (2015a).....	14
Tabelle 2: Exkretionsraten der Arzneimittel und der dazugehörigen Metaboliten sowie erwartetes und gemessenes Verhältnis dieser im Rohabwasser, veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).	24

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eintragswege von Arzneimitteln nach humanem Gebrauch über die Kläranlage in die Umwelt, vereinfachte Darstellung nach Umweltbundesamt (2014), veröffentlicht in Timpel et al. (im Druck).	8
Abbildung 2: Clofibrinsäure (links) und Salicylsäure (rechts).	9
Abbildung 3: Metabolismus des Venlafaxin nach Howell et al. (1993), veröffentlicht in Gurke et al. (2015b); ODV: O-Desmethyl-venlafaxin, NDV: N-Desmethylvenlafaxin, Gluc-ODV: glucuronidiertes O-Desmethylvenlafaxin.	11
Abbildung 4: Abwasserbehandlung in der Kläranlage Dresden-Kaditz, vereinfachte Darstellung nach Lucke (2014).	15
Abbildung 5: Extraktion von Abwasserproben nach Gurke et al. (2015b).	16
Abbildung 6: Grafische Darstellung der HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung sowie des Mehrstufengradienten und des MRM Modus.	18
Abbildung 7: Chromatogramm der Analytauswahl (55 Analyten und zwei nicht-isotopenmarkierte IS - Oxprenolol & Warfarin), veröffentlicht in Gurke et al. (2015b).	19
Abbildung 8: Gemessene Massenfrachten in Proben der verschiedenen Probennahmestellen (Zulauf, Vorklärung, Ablauf). Die Boxplots stellen die Ergebnisse des zehntägigen Monitorings dar (Mittelwert, 25 %- und 75 %-Quantil, Maximum- und Minimumwerte). Die Symbole markieren Massefrachten, die im Mai/Juni 2014 gemessen wurden (x: 11. Mai; o: 01. Juni; Δ: 23. Juni), veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).	21
Abbildung 9: Eliminierungsraten und 90 % Konfidenzintervalle berechnet aus den gemessenen, mittleren Frachten des zehntägigen Monitorings im Zu- und Ablauf der Kläranlage Dresden-Kaditz. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: **p < 0,05, *p < 0,1, veröffentlicht in Gurke et al. (2015a).	22

12 Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
Bei der Erarbeitung der dieser Dissertation zugrundeliegenden Veröffentlichungen haben folgende Personen mitgewirkt: Joachim Fauler, Julia Rossmann, Sara Schubert, Reinhard Oertel, Tobias Sandmann, Martin Rößler, Conrad Marx und Sam Diamond.
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

Publikationen als Erstautor:

Gurke R, Rossmann J, Schubert S, Sandmann T, Rößler M, Oertel R, Fauler J.
„Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples”

Journal of Chromatography B, 2015, 990, 23-30,

DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.008.

Gurke R, Rößler M, Marx C, Diamond S, Schubert S, Oertel R, Fauler J. „Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant”

Science of the Total Environment, 2015, 532, 762–770,

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.067.

Publikationen als Co-Autor:

- Rossmann J, Schubert S, Gurke R, Oertel R, Kirch W. „Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS“
Journal of Chromatography B, 2014, 969, 162-170,
DOI: 10.1016/j.chromb.2014.08.008.
- Rossmann J, Gurke R, Renner LD, Oertel R, Kirch W. „Evaluation of the matrix effect of different sample matrices for 33 pharmaceuticals by post-column infusion“
Journal of Chromatography B, 2015, 1000, 84-94,
DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.06.019.
- Timpel P, Gurke R, Marx C, Knoth H, Fauler J. „Antibiotikaeintrag in das urbane Abwasser Eine sekundärdatenbasierte Analyse zur Eintragsabschätzung am Beispiel der Stadt Dresden“
Bundesgesundheitsblatt, (im Druck)

Vorträge:

- Gurke R. „Einsatz von internen Standards in einer multitarget screening Methode“
Fachtagung ANTI-Resist: Untersuchung zu Einträgen von Antibiotika und der Bildung von Antibiotikaresistenzen im urbanen Abwasser am Beispiel Dresden, 21. und 22. Oktober 2013.

Posterpräsentationen:

- Gurke R, Rossmann J, Schubert S, Oertel R, Kirch W. „Development of a SPE-HPLC-ESI⁺-scheduled-MS/MS-method for the qualification and quantification of pharmaceuticals in an urban sewage system in Germany“
HPLC 2013 Amsterdam, 16. bis 20. Juni 2013.
- Gurke R, Rossmann J, Schubert S, Oertel R, Kirch W. „Entwicklung einer LC-MS/MS Multi-Target-Methode für die Detektion von Pharmazeutika im Zu- und Ablauf der Kläranlage Dresden-Kaditz“
LC-MS in der Umweltanalytik, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig, 16. bis 18. Juni 2014.

6. Erklärung zum Eigenanteil des Verfassers

Bei den dieser Dissertation zugrunde liegenden Fachartikeln bin ich alleiniger Erstautor, wurde aber in der Planung der Experimente sowie beim Verfassen der Manuskripte

durch die in den Artikeln gekennzeichneten Koautoren unterstützt. Teilweise basieren die zur Detektion der Analyten genutzten Parameter sowie das Protokoll für die Extraktion der Proben auf Vorarbeiten von Julia Rossmann, Sara Schubert und Reinhard Oertel. Die Liste der Analyten habe ich in eigenständiger Arbeit essentiell erweitert. Die dafür notwendige Auswertung der ambulanten Verschreibungsdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Tobias Sandmann. Das vorhandene SPE-Protokoll (Siehe Rossmann et al. 2014) wurde durch mich an die Anforderungen einer Multikomponenten-Methode angepasst und optimiert. Die Entwicklung, Optimierung und Validierung der genutzten HPLC-MS/MS-Methode wurde ebenfalls durch mich durchgeführt und durch Diskussionen mit meinen Kollegen begleitet. Das Konzept, sehr geringe Probenvolumina zur Analyse von Arzneimitteln im Abwasser zu verwenden, wurde dann erfolgreich in einem mehrtägigen Monitoring der Kläranlage Dresden Kaditz angewendet. Die dafür notwendigen Probenaufarbeitungen, Messungen und Auswertungen wurden ausschließlich durch mich durchgeführt. Bei der statistischen Evaluierung der Ergebnisse (Berechnung der Eliminierungsraten) habe ich Unterstützung durch Martin Rößler erhalten. Die Auswertung der Exkretionsraten der Arzneimittel sowie der Anteile der entstehenden Arzneimittelmetaboliten der ausgewählten Wirkstoffe erfolgte in Rücksprache mit Prof. Fauler.

Die Erarbeitung der Manuskripte sowie die Einarbeitung der Gutachten der Reviewer war hauptsächlich meine Aufgabe. Unterstützung durch meine Koautoren habe ich vor allem durch Verbesserungsvorschläge für die Manuskriptstruktur sowie das Fachenglisch erhalten.

7. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
8. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden anerkenne.
9. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Ort, Datum

Robert Gurke

13 Erklärung zur Einhaltung rechtlicher Vorschriften

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation:

- ☐ das zustimmende Votum der Ethikkommission bei klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen (Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: EK93042007)
- ☐ die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben / zur Mitwirkung....)
- ☐ die Einhaltung des Gentechnikgesetzes (Projektnummer....)
- ☐ die Einhaltung der Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus

Obige Punkte sind für die vorliegende Arbeit nicht zutreffend.

Ort, Datum

Robert Gurke

14 Anhang

14.1 Artikel Nr. 1: „Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples”

Autoren: Robert Gurke^{a,b}, Julia Rossmann^{a,b}, Sara Schubert^a, Tobias Sandmann^b, Martin Rößler^b, Reinhard Oertel^a, Joachim Fauler^a

^aInstitut für Klinische Pharmakologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, 01307 Dresden, Deutschland

^bForschungsverbund Public Health Sachsen und Sachsen Anhalt, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 33, 01307 Dresden, Deutschland

Journal: Journal of Chromatography B

DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.008

Das „Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences“ hat gegenwärtig (2015) einen Impact Factor von 2,729 und ist damit nach dem aktuellen Journal Citation Report® in der Kategorie „Biochemical Research Methods“ auf Position 32 (von 79) und in der Kategorie „Chemistry, Analytical“ auf Position 22 (von 74) gelistet.



Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples



Robert Gurke^{a,b,*}, Julia Rossmann^{a,b}, Sara Schubert^a, Tobias Sandmann^b, Martin Rößler^b, Reinhard Oertel^a, Joachim Fauler^a

^a Institute of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, D-01307 Dresden, Germany

^b Research Association Public Health Saxony and Saxony Anhalt, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 33, D-01307 Dresden, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2014

Accepted 16 March 2015

Available online 23 March 2015

Keywords:

Pharmaceutical

Metabolites

Sewage

SPE-HPLC–MS/MS

Multi-target

Regional prescription data

ABSTRACT

Based on regional prescription data several pharmaceuticals with variable amounts of prescription and corresponding metabolites were selected and analyzed in influent and effluent samples of the sewage treatment plant (STP) in Dresden, Germany. Pharmaceuticals of the following most prescribed therapeutic groups were chosen: antibiotics, antifungals, anticonvulsants, antipsychotics, antidepressants, and cardiovascular active compounds like beta blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors. To analyze the selected compounds, a multi-target method was developed and applied to 24-h composite wastewater samples for three single days in May and June 2014. The method was based on a cleanup of a sample with a volume of 1 mL using solid phase extraction followed by a high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer. Analytes were separated in a 15 min chromatographic separation and quantified using 23 Internal Standards and a calibration curve in 40-fold diluted blank urine. The limit of quantification varied between 50 and 200 ng/L and for all analytes good accuracy and precision as well as linearity for the calibration curve with the correlation coefficient R^2 higher than 0.99 was reached. A total of 41 and 40 of the selected 55 analytes were detected and quantified in the influent and effluent samples of the studied STP, respectively. Valsartan was the compound with the highest maximum concentration in influent (27.1 µg/L) and effluent (15.7 µg/L). Furthermore, analytes like bezafibrate, candesartan, carbamazepine, gabapentin, metoprolol, levetiracetam, pregabalin and telmisartan as well as the metabolite *O*-desmethyl venlafaxine were detectable in influent and effluent samples, respectively, with a concentration higher than 1 µg/L.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pharmaceuticals in the aquatic environment are of growing concern and became a central issue of numerous studies during the last decades [1–7]. Several studies proved the contamination of the aquatic environment with pharmaceuticals, for example in the rivers Rhine [8,9] and Elbe [10] in Germany. But there are still great gaps in knowledge about the discharged drugs. A crucial point in the development of a monitoring program is the selection of possible targets. This selection can be based on the evaluation of existing

studies or consumption data. Oosterhuis et al. showed that national consumption data of pharmaceuticals can be a feasible starting position for the selection of possible targets [11]. Additionally, the study showed that using regional consumption data is a possible way to improve the accuracy of the prediction.

After consumption, a high percentage of active compounds pass through the human body and is released unchanged into the sewage system [6,7]. The amount of discharged drug is highly compound-specific and data for the excretion factors are often uncertain. The excretion is probably the main input of pharmaceuticals into the sewage system. Further, the disposal of unused medicine through the toilet and industrial sewage might cause high concentrations of drugs in the sewage system [3]. Aside from the excretion of the original pharmaceutical compound metabolites are also released into the environment via urine and feces. In general, pharmaceuticals are lipophilic compounds which have

* Corresponding author at: Institute of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, D-01307 Dresden, Germany. Tel.: +49 35145818707.

E-mail address: robert.gurke@tu-dresden.de (R. Gurke).

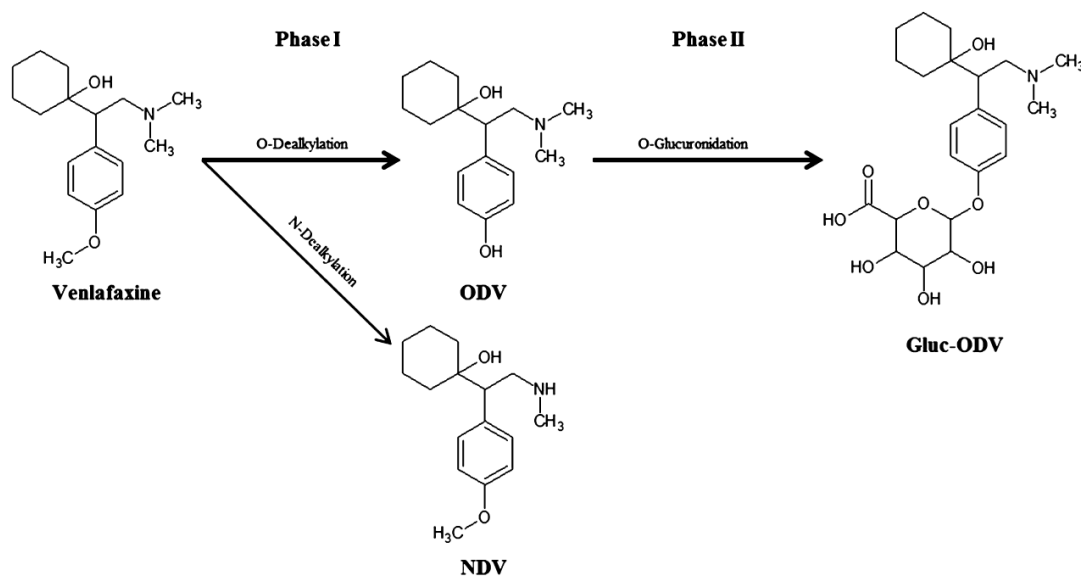


Fig. 1. Metabolism of venlafaxine; ODV: O-desmethyl venlafaxine, NDV: N-desmethyl venlafaxine, Gluc-ODV: O-desmethyl venlafaxine glucuronide.

to be bio-transformed to increase the hydrophility to be excreted by the kidney. Fig. 1 illustrates exemplary the main routes of metabolism for venlafaxine [12]. Metabolism is historically divided into two phases with different compound specific reactions. Phase I comprises oxidative, reductive and hydrolytic reactions like dealkylation, dehalogenation or decomposition of esters. Phase II includes conjugation reactions like glucuronidation or acetylation which help to further increase the hydrophility of the phase I metabolites [13]. In case of venlafaxine the O-desmethyl venlafaxine (ODV) is the main metabolite of the bio-transformation. Tracer studies in man have shown that about 29% of the applied venlafaxine dose are released into urine as ODV and 26% are released as glucuronidated ODV [12].

Studies showed that the pharmaceuticals and their metabolites are often insufficiently removed while passing through the sewage treatment plant (STP) [7]. In effluents of STPs, concentrations in the range of ng/L to µg/L of many pharmaceuticals are detectable [11,14–17]. The ecotoxicological effects of pharmaceuticals to aquatic organisms are mostly inadequately investigated and so far, active metabolites have often not been considered. A few studies showed possible effects on different types of organisms. For example; diclofenac caused the nearly complete breakdown of the vulture population in Pakistan [18], ethinylestradiol generates reproductive failures in fish [19] and antibiotics yield resistant bacteria [20]. The effect of mixtures has not been proved very often and it can be expected, that the ecotoxicological outcomes are even worse than the known effects of single pharmaceuticals [5].

For that reason, several multi-target methods for monitoring approaches have been presented since the beginning of the research considering pharmaceuticals in the aquatic environment [8,11,15,21–26]. Recently, all methods have been based on solid phase extraction (SPE) of a large-volume sample followed by liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS).

The aim of the study was to develop a SPE-HPLC-MS/MS method for most prescribed pharmaceuticals using small-volume samples and automatic sample preparation and to investigate, whether regional consumption data provided by a health insurance company can be used as source for the selection of monitoring targets in the STP, clarifying the sewage of the appendent catchment area. Compounds were chosen out of several drug classes including

antibiotics, antifungals, anticonvulsants, antipsychotics, antidepressants, analgesics, and cardiovascular compounds like beta blockers and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. The newly developed SPE-HPLC-MS/MS method was validated according to the EU Commission Decision 2002/657/EC [27], a validation instruction of Peters et al. for methods in toxicological analysis [28], and former publications considering pharmaceutical analysis in sewage or other aqueous samples [21,23,29,30]. Furthermore, the method was applied in the analysis of sewage samples from the STP Dresden Kaditz, Germany, taken on three nonconsecutive days in May and June 2014.

2. Experimental

2.1. Sampling area and selection of pharmaceutical compounds

For the investigation of the sewage, the STP Dresden Kaditz, Germany, (740,000 inhabitant equivalent, sewage water of 55 million m³/a, hydraulic retention time of 24 h) was selected. Samples of 1 L were taken as flow-proportional 24-h composite samples from the influent and effluent, respectively, and stored at 4 °C until they were analyzed. All samples were analyzed within one day after the sampling. Samples were taken on May 11th (Day 1), June 01st (Day 2) and June 23rd (Day 3) 2014.

The selection of pharmaceuticals was based on regional prescription data for the city Dresden provided by the health insurance company "AOK PLUS" which cover the period from 2008 until 2012 including all ambulant medical prescriptions. In the investigated region 40% of all inhabitants are insured by this company, so the provided data represents a good database for the selection of possible analytes. The pharmaceuticals of different active substance groups were analyzed using the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System and the used amount was calculated using the substance-specific daily defined dose (DDD). ATC-Codes and DDD's were used as provided by the German Institute of Medical Documentation and Information (DIMDI). The compilation of the data was conducted with the SQL Server Management Studio 2008 software.

2.2. Chemicals and materials

The isotopically labeled standards amitriptyline d₃, carbamazepine d₁₀, citalopram d₆, clozapine d₄, doxepin d₃, fluoxetine d₆, norfluoxetine d₆, gabapentin d₁₀, lamotrigine ¹³C, ¹⁵N₄, lev-
 etiracetam d₆, paroxetine d₆, pregabalin d₆, propranolol d₇, quetiapine d₈, trimipramine d₃ and venlafaxine d₆, the metabolites norfluoxetine (NFL), *N*-desmethyl citalopram (NCI), *N*-desmethyl clozapine (NCL) and *N*-desmethyl mirtazapine (NMI) as well as the pharmaceuticals oxcarbazepine and citalopram were purchased as solution in methanol (0.1 mg/mL or 1 mg/mL) from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). The solids 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (MHD) and telmisartan d₃ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), sulfamethoxazole ¹³C₆ and trimethoprim d₉ (Witega, Berlin, Germany), valsartan d₆ (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France), *O*-desmethyl venlafaxine (ODV) and venlafaxine (Wyeth Madison, NJ, USA), gabapentin (Pfizer, New York, NY, USA), ramipril (Hoechst AG, Frankfurt, Germany), trimethoprim (Synopharm-fagron, Barsbüttel, Germany), clozapine (Novartis Pharma, Basel, Switzerland), celiprolol, talinolol and telmisartan (LGC Standards, Wesel, Germany), candesartan (Astra Zeneca, Wedel, Germany) and melperone (TOCRIS bioscience, Bristol, UK) were dissolved in methanol to generate a 1 mg/mL stock solution. All other standards were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA) and processed as the before mentioned standards. Stock solutions were stored at minus 20 °C in the dark.

Acetonitrile, methanol (HiperSolv, HPLC-grade) and ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (LC-MS grade) and Na₂EDTA (ACS reagents) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and water (HPLC-grade) from VWR (Darmstadt, Germany).

2.3. Sample preparation and quantification

All samples were prepared by solid phase extraction (SPE) using an Abimed ASPEC XL (Gilson, Middleton, WI, USA) with Oasis HLB 10 mg Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA, USA). Before extraction, sewage samples were mixed with a Na₂EDTA solution to create a concentration of 8 mg/mL, shaken for 5 min, centrifuged at 6000 × *g* for 3 min and filtered through a glass fiber filter (<0.9 μm, WICOM, Heppenheim, Germany). 1.0 mL of sewage water samples were adjusted to pH 3 by addition of a 10% formic acid solution, spiked with 100 μL IS solution (10 μg/L) and extracted by SPE with the following procedure:

Condition: (1) 0.75 mL methanol with 9% deionized water and 1% formic acid (dispense flow rate (Disp): 6 mL/min; aspirate flow rate (Asp): 10 mL/min); (2) 0.75 mL deionized water (Disp: 6 mL/min); and (3) 1.0 mL 10 mM Na₂EDTA (Disp: 6 mL/min; Asp: 10 mL/min).
Load: 2 × 0.65 mL acidified sample (Disp: 1 mL/min; Asp: 6 mL/min); air push 1.0 mL.
Wash: 0.5 mL deionized water (Disp: 1 mL/min); air push 2.0 mL.
Elute: 0.75 mL methanol with 9% deionized water and 1% formic acid (Disp: 6 mL/min; Asp: 10 mL/min); air push 1.0 mL.

The eluates were evaporated to dryness under a gentle air stream at 50 °C and redissolved in 250 μL mixture of solvent A and solvent B (80/20, v/v). The solvents A (97/3/0.05; v/v/v) and B (5/95/0.05; v/v/v) were a composition of 2 mM ammonium acetate solution, acetonitrile and formic acid.

For the quantification, a 9-point calibration curve with a range from 50 to 20,000 ng/L in 40-fold diluted blank urine with Internals Standards was used. The urine was adjusted to pH 3 and spiked with the required amount of standard stock solution and 100 μL

of IS solution. The solid phase extraction of the urine samples was done as described for the sewage samples.

2.4. Instrumentation

An HPLC-MS/MS system, consisting of a Dionex-HPLC composed of an UltiMate3000 Pump and Autosampler (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany) with a Chromeleon Chromatography Data System (Dionex Softron, Idstein, Germany) and coupled to an API 4000 tandem mass spectrometer (AB Sciex, Framingham MA, USA) equipped with an electrospray ionization source (ESI), was used for the analyses of the samples.

The chromatographic separation was performed with a Synergi 2.5u HydroRP 100A, 100 × 2.0 mm and a C18 security guard 4 mm × 2 mm (both Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). A multi-step gradient as shown in Table 1 was selected and a flow rate of 0.3 mL/min and an injection volume of 20 μL were chosen. The column temperature was held at 40 °C with a column oven (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The mass spectrometric analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode with positive ionization. The MS parameters were as follows: capillary voltage 5000 V, source temperature 450 °C, desolvation temperature 400 °C, curtain gas flow 30 L/h, collision gas flow 6 L/h. Nitrogen was used as nebulizer and as collision gas. The Analyst data system 1.6 (AB Sciex, Framingham MA, USA) was applied for MS control and for the peak area evaluation, regression analysis of calibration curves and calculation of concentrations.

2.5. Method validation

The method was tested in consideration of selectivity, linearity, lower limit of quantification (LLOQ), upper limit of quantification (ULOQ), repeatability, intermediate precision, intra- and interday accuracy, matrix effect, recovery and short time stability.

Selectivity was verified by measuring two MRM transitions per analyte and calculating the specific ratio of these. Requirements for a positive detection of the analytes were a retention time within a range of 20% around the average value, a signal to noise (*S/N*) ratio higher than 10 and a ratio between the two transitions with a deviation of at most 20% from the average value.

The linearity was tested by linear regression with a 1/*x*-weighting. The lowest value for the calibration curve and also LLOQ was determined by conformance to the requirements of selectivity. In particular, the repeatability of the determination as well as the accuracy was proved with a maximum deviation of 20% at the LLOQ. The ULOQ was determined as highest concentration of the calibration curve up to which a sufficient linearity was given (*R*² > 0.99).

Recovery (RE) was calculated by comparing the signal intensities of a pre and post SPE spiked sample. The matrix effect (ME) was calculated by comparing the signal intensity of the post SPE spiked samples with a convenient probe prepared in a mixture of solvent A and solvent B (80/20, v/v). This was done for 40-fold diluted blank urine, influent and effluent samples on a spiking level of 500 ng/L and 5000 ng/L. Because all sewage samples contained measurable amounts of analytes, the signal intensities had to be corrected by the blank values prior to the calculation.

The pre SPE spiked samples were also used to evaluate the repeatability and intermediate precision as well as intra- and

Table 1
Multi-step-gradient for chromatographic separation.

Time [min]	0.0	0.2	0.5	8.0	9.0	11.8	12.0	14.8
Solvent A [%]	100	100	80	50	0	0	100	100
Solvent B [%]	0	0	20	50	100	100	0	0

interday accuracy. For repeatability and intraday accuracy, four samples of urine, influent and effluent were spiked with stock solution to create a concentration level of 500 and 5000 ng/L, respectively. The samples were quantified using IS and a standard curve in diluted urine. The calculated concentrations were corrected for the blank value. For intermediate precision and interday accuracy, the procedure was repeated on three nonconsecutive days with two instead of four samples per day. To analyze the parameters, the average, blank value corrected concentration was calculated for each day and accuracy and precision were calculated over three days. Intra- and interday accuracy are given as percentage of the expected concentrations and repeatability and intermediate precision are given as relative standard deviation (RSD). All statistical analysis was conducted using the software Stata 11.1.

All samples were analyzed within one day after the sampling. To ensure that the analytes are stable while stored for one day, a diluted urine sample as well as an influent and effluent sample were spiked to create a 1000 ng/L concentration, stored over night at 4 °C in a glass bottle and analyzed on the following day.

3. Results and discussion

3.1. Method development

Pharmaceutical compounds were selected based on the prescribed amount in the city Dresden, Germany, in the period from 2008 until 2012 (Table S1). Pharmaceutical compounds which were incompatible with positive electrospray ionization or reversed phase chromatography were excluded a priori out of technical limitations. Next to compounds with high prescription amounts, pharmaceuticals with lower prescription amounts like haloperidol, voriconazole, fluoxetine and fluconazole were also included in the developed method, to evaluate up to which prescription level the pharmaceuticals are detectable in the sewage samples. Furthermore, the metabolites *O*-desmethyl venlafaxine (ODV), norfluoxetine (NFL), *N*-desmethyl clozapine (NCL), *N*-desmethyl citalopram (NCL), *N*-desmethyl mirtazapine (NMI) and 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (monohydroxy derivate, MHD) were also considered in the method.

Based on previous studies by Rossmann et al. [31], a method specially developed for antibiotics was enlarged and adjusted to the needs of a multi-target method for 55 analytes. For the mass spectrometric parameter optimization, a standard solution (10 µg/L) of each analyte and IS was prepared in deionized water and directly infused into the MS/MS-system by a syringe pump. As precursor ion mass, the single protonated molecule mass was chosen and the declustering potential (DP), collision energy (CE) and collision cell exit potential (CXP) were optimized (Tables S2 and S3). Poor fragmentation patterns with low intensity or high background were excluded, and for each analyte two transitions were chosen and measured in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The transition with the better signal to noise ratio was chosen for quantification (quantifier) and the other for qualification (qualifier).

The chromatographic separation was optimized by injection of a standard solution of all analytes and IS (10 µg/L) and variation of the gradient. The best results were obtained with a multi-step gradient with the first analyte eluting after 3.3 min and the last after 10.6 min (Fig. 2). To ensure an adequate number of data points per analyte, the measurements were performed with time scheduled data acquisition and a cycle time of one second.

3.2. Method validation

Except for the metabolite norfluoxetine and the component tramadol, it was possible to create two fragmentation lanes for all

analytes and IS as required by the EU regulations (EU Commission Decision 2002/657/EC). In case of gabapentin and pregabalin, the minor intensive fragmentation was chosen for the quantification, because of matrix interferences on the other fragmentation lanes. As IS, isotopically labeled substances or pharmaceuticals with low numbers of prescription were chosen. In case of non-availability of isotopically labeled standards, an IS with a similar retention time and high accordance in matrix effect and recovery was selected.

The linearity was qualified by the correlation coefficient R^2 and was higher than 0.99 for all selected pharmaceutical compounds (Table S2). According to Peters et al. [28], the LLoQ was defined as the lowest point of the calibration curve with a deviation in repeatability less than 20% and an accuracy plus or minus 20% of the expected value (Table S2). Because no blank sewage matrix was available, this procedure was only feasible for the standard curve in 40-fold diluted blank urine. To assure the measurement in sewage samples, the signals were always tested for a *S/N*-ratio higher than 10 and a ratio between quantifier and qualifier (*Q/Q*) near the average determined ratio of the two fragmentation patterns. For 49 of 55 analytes a LLoQ of 50 ng/L was determined. Only pregabalin, primidone and the metabolite MHD (LLoQ=100 ng/L) as well as gabapentin and levetiracetam (LLoQ=200 ng/L) had a higher LLoQ. Because previous studies showed concentrations higher 20 µg/L for valsartan in the investigated sewage samples a calibration curve from 100 to 40,000 ng/L was necessary for this analyte and so the LLoQ was 100 ng/L.

Furthermore, matrix effect and recovery as mentioned by Taylor were verified to ensure a good recovery of the analytes by the used SPE method and to evaluate the suppressing or enhancing effects for the signal intensity due to coeluting matrix components [30]. Because sewage samples already contained a high amount of candesartan, carbamazepine, eprosartan, gabapentin, irbesartan, lamotrigine, levetiracetam (only influent), metoprolol, pregabalin, telmisartan and valsartan, the calculations for these analytes were conducted only for the 5000 ng/L spiking. The evaluation of RE and ME showed that the parameters were highly comparable for urine and effluent samples for most of the analytes (Table S4) and the trend in influent samples was at least mostly the same. Larger differences in the comparison of urine and effluent samples were only determined for atenolol, fluoxetine and NFL, metoprolol, triamterene, trimethoprim and ODV. But in combination with the usage of suitable IS quantification, it was possible to properly consider ME and RE for all selected analytes. Most of the analytes had a recovery higher than 60% and the ME was stronger for influent than for effluent samples. However, gabapentin and pregabalin have to be considered critically in particular because of low recoveries and high matrix influence on the signals. To ensure the results, both analytes were quantified using a corresponding isotopically labeled IS.

Repeatability and intermediate precision are acceptable for all analytes, except for candesartan and NMI. According to the RSD criterion, both pharmaceuticals show individual cases of irregularity (RSD > 15%). Interday accuracy is always in the range between 80% and 120%. In case of intraday accuracy, the analytes atenolol, bisoprolol, clindamycin, clozapine, metoprolol, propafenone, sertraline, sotalol and triamterene showed values slightly higher than 120% or lower than 80% (Tables S5 and S6).

Stability was tested for the storage of the samples over night at 4 °C in glass bottles. No compound showed indication of instability under this storage conditions (data not shown).

3.3. Application to wastewater samples

The developed method was tested on three nonconsecutive days in May and June 2014. The results of the measurements are shown in Table 2.

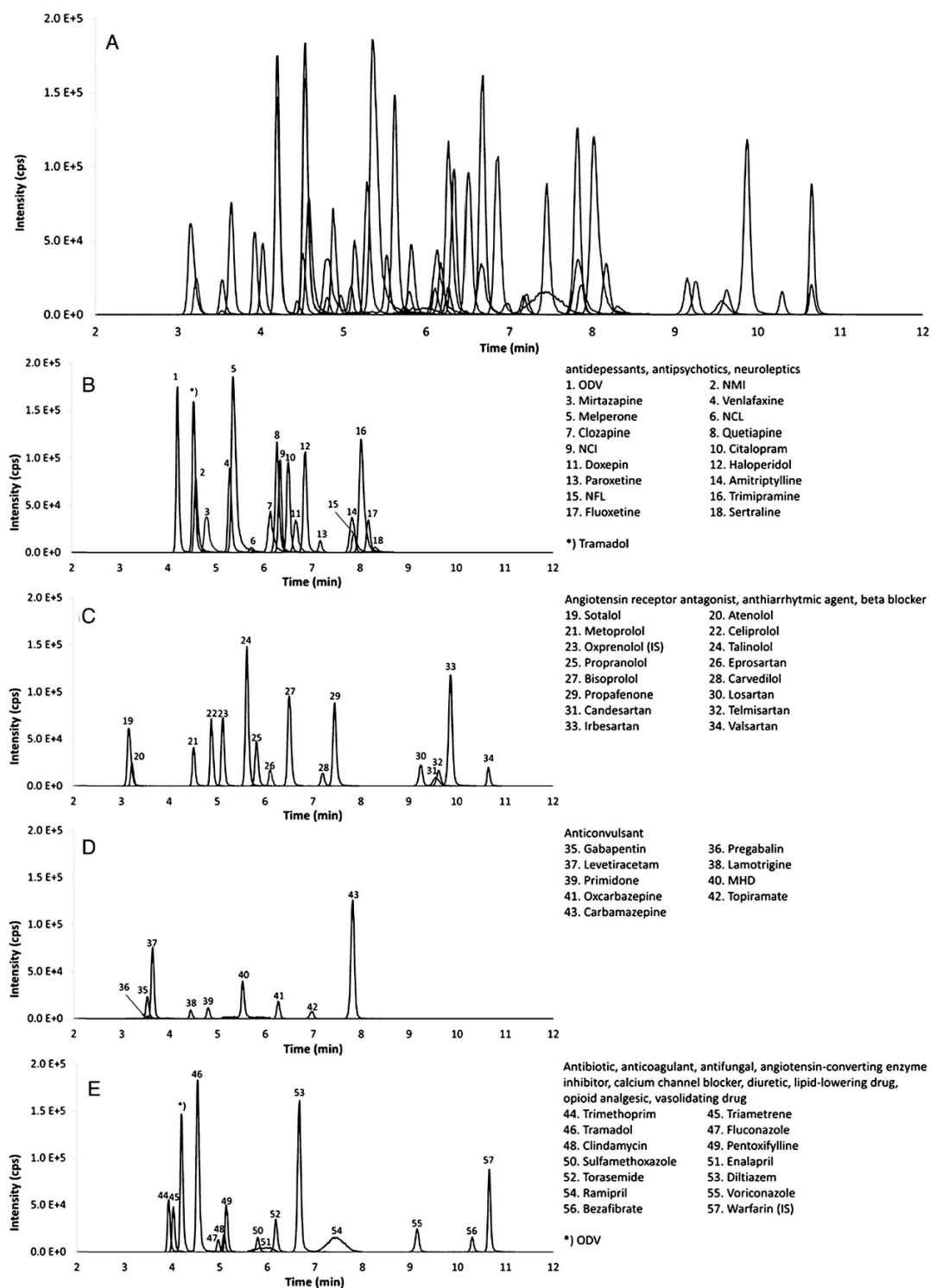


Fig. 2. (A) Chromatogram of a standard solution (55 analytes and two non-isotopically labeled IS); (B–E) chromatogram of the analytes with affiliation of the individual compounds to the signals (ODV: *O*-desmethyl venlafaxine, NFL: norfluoxetine, NCL: *N*-desmethyl clozapine, NCI: *N*-desmethyl citalopram, NMI: *N*-desmethyl mirtazapine, MHD: 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine). * Tramadol and ODV have similar fragmentation patterns, so a signal for tramadol can be seen in the fragmentation lane of ODV and vice versa; but because the two signals are baseline separated, a quantification is possible.

Table 2

Concentrations (ng/L) in influent and effluent samples of the STP Dresden Kaditz (ODV: O-desmethyl venlafaxine, NFL: norfluoxetine, NCL: N-desmethyl clozapine, NCI: N-desmethyl citalopram, NMI: N-desmethyl mirtazapine, MHD: 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine).

Drug class	Analyte	Influent			Effluent		
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
Angiotensin-converting enzyme inhibitor	Enalapril	224.8	162.0	204.8	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Ramipril	120.3	92.5	114.3	92.6	72.7	91.3
Angiotensin receptor antagonist	Candesartan	1470.0	1442.5	1712.5	1202.5	1040.0	1317.5
	Eprosartan	3295.0	2765.0	3112.5	1522.5	1122.5	708.5
	Irbesartan	1460.0	1482.5	1745.0	1347.5	1170.0	1570.0
	Losartan	696.8	626.8	739.3	417.0	306.3	256.3
	Telmisartan	1820.0	1712.5	2180.0	1322.5	635.5	748.5
	Valsartan	22,100.0	19,425.0	27,050.0	15,700.0	9802.5	4482.5
Antiarrhythmic agent	Propafenone	84.1	72.0	58.6	82.6	52.0	55.0
	Sotalol	151.5	143.5	175.5	796.0	153.3	186.3
Antibiotic	Clindamycin	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	138.3	102.9	141.3
	Sulfamethoxazole	271.0	199.8	320.8	82.7	112.9	118.5
	Trimethoprim	170.8	179.0	187.8	178.0	169.8	200.8
Anticonvulsant	Carbamazepine	1120.0	893.0	1310.0	1432.5	1010.5	1542.5
	Gabapentin	12,150.0	11,175.0	13,400.0	10,355.0	9127.5	11,950.0
	Lamotrigine	607.0	582.0	752.0	939.8	764.3	1117.5
	Levetiracetam	8920.0	8157.5	10,825.0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Oxcarbazepine	267.3	220.8	351.8	545.5	397.3	781.0
	MHD	1127.5	1130.0	1675.0	756.3	650.5	965.3
	Pregabalin	2245.0	2015.0	2357.5	811.0	839.3	810.0
	Primidone	234.0	223.0	325.8	213.3	180.0	267.0
	Topiramate	123.0	145.0	167.0	107.9	109.0	162.0
Antidepressant	Amitriptyline	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	51.7	<LLOQ	<LLOQ
	Citalopram	157.0	197.0	179.5	219.3	186.0	232.0
	NCI	90.0	106.8	99.4	131.0	102.6	133.3
	Doxepin	67.7	71.6	64.0	75.0	68.6	78.1
	Fluoxetine	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	NFL	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Mirtazapine	118.0	104.0	119.3	118.5	77.3	109.3
	NMI	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Paroxetine	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Sertraline	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Trimipramine	51.8	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Venlafaxine	562.0	527.3	608.0	566.0	447.5	603.5
	ODV	930.3	1107.5	1377.5	944.3	1013.8	1347.5
Antifungal drug	Fluconazole	158.5	167.5	163.3	162.5	151.3	163.0
	Voriconazole	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
Antipsychotic	Clozapine	142.5	153.5	128.8	181.8	164.5	101.6
	NCL	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Quetiapine	71.7	81.8	86.9	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
Beta blocker	Atenolol	424.3	367.5	455.5	318.5	263.8	258.0
	Bisoprolol	594.3	582.8	777.5	466.3	1680.0	720.5
	Carvedilol	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Celiprolol	373.8	372.8	457.8	376.0	286.8	408.5
	Metoprolol	3780.0	3510.0	4722.5	3715.0	3172.5	4470.0
	Propranolol	71.3	71.3	94.2	84.4	56.3	96.9
	Talinolol	554.3	414.3	516.3	510.5	368.8	487.5
Calcium channel blocker	Diltiazem	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
Diuretic	Torsemide	181.3	173.0	201.5	189.8	156.3	228.3
	Triamterene	<LLOQ	<LLOQ	55.3	59.5	<LLOQ	66.7
Lipid-lowering drug	Bezafibrate	1335.0	1275.0	1462.5	724.0	608.8	568.3
Neuroleptic	Haloperidol	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
	Melperone	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	58.0	<LLOQ	62.2
Opioid analgesic	Tramadol	662.0	554.0	662.8	672.0	533.8	691.8
Vasodilating drug	Pentoxifylline	61.5	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

In the influent, 41 of 55 pharmaceutical compounds were detectable at least once with a concentration higher than the LLOQ. A total of 39 of these pharmaceutical compounds were measurable in all 24-h composite samples. In the effluent, 40 analytes were quantifiable at least once and 37 in all taken samples. Noticeable are the high numbers of 13 and 11 analytes, respectively, with a maximum concentration higher than 1 µg/L in influent or effluent.

The highest concentrations were found for valsartan in Day 3 influent sample (27.1 µg/L) as well as the Day 1 effluent sample (15.7 µg/L). When examining the determined concentrations and the determined LLOQ's it has to be considered that the effluent is diluted about 220 times when it is discharged into the river Elbe (considering the mean low flow of the river in the period from 2005 until 2012).

Metoprolol was the pharmaceutical with the highest amount of prescription in 2012 in the area of Dresden followed by valsartan, levetiracetam and gabapentin. Taking into account that these pharmaceuticals are metabolized in the body and excreted unchanged with different percentages (unchanged excretion metoprolol: 11% [32], valsartan: 80% [33], levetiracetam: 66% [34], gabapentin: 100% [35]) the found concentrations in the influent samples fit very well with the expected order. The same is true for pharmaceuticals with low prescription amounts like haloperidol, fluoxetine or voriconazol which were not detectable in any sample. Furthermore, it has to be noticed that the concentration of the metabolites ODV and MHD are higher in influent and effluent samples, respectively, than the concentration of the corresponding pharmaceutical compounds venlafaxine and oxcarbazepine in the respective samples. This illustrates that it is always necessary to consider metabolism when selecting the analytes, especially for pharmaceuticals with a high ratio of bio-transformation. Altogether, it can be concluded that the selection of possible targets based on regional prescription data is a useful tool in order to develop a method to monitor pharmaceuticals in an urban sewage system.

4. Conclusions

An HPLC–MS/MS method with a total runtime of 15 min for the quantification of 55 analytes in influent and effluent STP samples, using 23 IS and a small sample volume of 1 mL for the SPE was successfully developed and validated. Because of the low sample volume, the short chromatographic runtime and the low flow rate the developed method is cost and time saving compared to previously published methods. The quantification of the compounds using IS and a calibration curve in diluted blank urine generates good linearity as well as high intra- and interday accuracy with good repeatability and intermediate precision.

A total of 41 and 40 analytes were quantified in the influent and effluent of the studied STP, respectively. Valsartan was the compound with the highest maximum concentration in influent (27.1 µg/L) and effluent (15.7 µg/L). Furthermore, 13 and 11 analytes, respectively, were detectable with a concentration higher than 1 µg/L in influent or effluent. The selection of possible monitoring targets based on regional prescription data is a useful tool for the development of a new monitoring method. But it is always necessary to consider metabolism when selecting the analytes in order to gain a complete picture of the pollution of the aquatic environment by the discharge of sewage into surface waters.

Acknowledgments

This study is conducted within the InnoMedTec project (Grant no. 100098212), which is funded by the ESF and the Free State of Saxony. We would also like to thank the Stadtentwässerung Dresden GmbH, especially R. Knoche and N. Lucke, for providing the samples from the STP. U. Mann and K. Weber (Institute of Clinical Pharmacology) are greatly appreciated for helping to analyze the wastewater samples. Thanks to V. Mühlbauer for the support regarding the evaluation of prescription data and to S. Diamond, M. Arnhold and N. Medland for improving the scientific English. Many thanks to the reviewers for their helpful comments and suggestions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.008>.

References

- [1] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- [2] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, *J. Hazard. Mater.* 175 (2010) 45–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>.
- [3] S.T. Glassmeyer, E.K. Hinchey, S.E. Boehme, C.G. Daughton, I.S. Ruhoy, O. Conerly, et al., Disposal practices for unwanted residential medications in the United States, *Environ. Int.* 35 (2009) 566–572, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.007>.
- [4] J.M. Brausch, K.A. Connors, B.W. Brooks, G.M. Rand, Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 218 (2012) 1–99, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4_1.
- [5] M.S. Kostich, J.M. Lazorchak, Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use, *Sci. Total Environ.* 389 (2008) 329–339, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.008>.
- [6] S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environ. Int.* 35 (2009) 803–814, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>.
- [7] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review, *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 123–155, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- [8] T.A. Ternes, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.* 32 (1998) 3245–3260, [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2).
- [9] F. Sacher, M. Ehmann, S. Gabriel, C. Graf, H.-J. Brauch, Pharmaceutical residues in the river Rhine—results of a one-decade monitoring programme, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 664–670, <http://dx.doi.org/10.1039/b800701b>.
- [10] S. Wiegand, A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler, H. Reincke, et al., Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries, *Chemosphere* 57 (2004) 107–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.017>.
- [11] M. Oosterhuis, F. Sacher, T.L. ter Laak, Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data, *Sci. Total Environ.* 442 (2013) 380–388, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.046>.
- [12] S.R. Howell, G.E. Husbands, J.A. Scatina, S.F. Sisenwine, Metabolic disposition of ¹⁴C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man, *Xenobiotica* 23 (1993) 349–359, <http://dx.doi.org/10.3109/00498259309057023>.
- [13] F.J. Gonzalez, R.H. Tukey, Drug metabolism, in: L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker (Eds.), *Goodman Gilman's Pharmacol. Basis Ther.*, 11th ed., McGraw-Hill, 2006, pp. 71–91.
- [14] C.D. Metcalfe, B.G. Koenig, D.T. Bennie, M. Servos, T.A. Ternes, R. Hirsch, Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 2872–2880, <http://dx.doi.org/10.1897/02-469>.
- [15] N.A. Al-Odaini, M.P. Zakaria, M.I. Yaziz, S. Surif, Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6791–6806, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.033>.
- [16] M. Scheurer, M. Ramil, C.D. Metcalfe, S. Groh, T. Ternes, The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 845–856, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3225-7>.
- [17] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberger, K.-L. Kratz, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109–118, [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4).
- [18] J.L. Oaks, M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B.A. Rideout, et al., Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan, *Nature* 427 (2004) 630–633, <http://dx.doi.org/10.1038/nature02317>.
- [19] J.P. Nash, D.E. Kime, L.T.M. Van der Ven, P.W. Wester, F. Brion, G. Maack, et al., Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 1725–1733, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7209>.
- [20] K. Kümmerer, A. Henninger, Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent, *Clin. Microbiol. Infect.* 9 (2003) 1203–1214, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x>.
- [21] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura, Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 146–158, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.077>.
- [22] R. Grabic, J. Fick, R.H. Lindberg, G. Fedorova, M. Tysklind, Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry, *Talanta* 100 (2012) 183–195, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.032>.
- [23] M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* 70 (2006) 678–690, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>.
- [24] M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, F. Ventura, Fast liquid chromatography–quadrupole–linear ion trap mass spectrometry for the

- analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4212–4222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.007>.
- [25] Y. Valcárcel, S.G. Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, R.R. Maroto, A. Gil, M. Catalá, Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain, *Chemosphere* 82 (2011) 1062–1071, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.041>.
- [26] A.L. Batt, M.S. Kostich, J.M. Lazorchak, Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5021–5030, <http://dx.doi.org/10.1021/ac800066n>.
- [27] European Commission, 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
- [28] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.
- [29] K. Wille, H. Noppe, K. Verheyden, J. Vanden Bussche, E. De Wulf, P. Van Caeter, et al., Validation and application of an LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1797–1808, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3702-z>.
- [30] P.J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>.
- [31] J. Rossmann, S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel, W. Kirch, Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE–LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B* 969 (2014) 162–170, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.008>.
- [32] J. Lienert, K. Güdel, B.I. Escher, Screening Method for Ecotoxicological Hazard Assessment of 42 Pharmaceuticals Considering Human Metabolism and Excretory Routes, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4471–4478, <http://dx.doi.org/10.1021/es0627693>.
- [33] A. Bayer, R. Asner, W. Schüssler, W. Kopf, K. Weiß, M. Sengl, et al., Behavior of sartans (antihypertensive drugs) in wastewater treatment plants, their occurrence and risk for the aquatic environment, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21 (2014) 10830–10839, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3060-z>.
- [34] H. Fenet, L. Arpin-Pont, A. Vanhoutte-Brunier, D. Munaron, A. Fiandrino, M.-J. Martínez Bueno, et al., Reducing PEC uncertainty in coastal zones: a case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites, *Environ. Int.* 68 (2014) 177–184, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.025>.
- [35] S. Ortiz de García, G. Pinto Pinto, P. García Encina, R. Irusta Mata, Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain, *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 451–465, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.057>.

Supplementary Data zu Artikel „Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples”

Table S 1: Selected Pharmaceuticals.

Analyte	ATC-Code	Drug class	Provider	Prescribed amounts provided from “AOK PLUS“ for the city Dresden (kg)				
				2008	2009	2010	2011	2012
Amitriptyline	N06AA09	antidepressant	Sigma	10.07	10.35	11.07	11.65	11.42
Atenolol	C07AB03	beta blocker	Sigma	15.98	14.65	13.31	12.12	11.37
Bezafibrate	C10AB02	lipid-lowering drug	Sigma	59.18	51.66	44.82	42.33	36.65
Bisoprolol	C07AB07	beta blocker	Merck	18.44	18.65	18.83	18.85	18.53
Candesartan	C09CA06	angiotensin receptor antagonist	AstraZeneca	8.95	9.08	9.42	9.38	9.35
Carbamazepine	N03AF01	anticonvulsant	Sigma	191.09	174.57	162.18	151.44	138.48
Carvedilol	C07AG02	beta blocker	Moehs Iberica S.L.	18.13	17.75	17.62	16.71	15.81
Celiprolol	C07AB08	beta blocker	LGC Standards	16.06	14.85	12.95	12.00	11.43
Citalopram	N06AB04	antidepressant	Cerilliant	12.34	13.33	15.22	19.41	20.39
Clindamycin	J01FF0	antibiotic	Sigma	20.76	58.92	60.76	58.30	54.86
Clozapine	N05AH02	antipsychotic	Novartis Pharma	14.85	15.46	14.53	14.58	14.57
Diltiazem	C08DB01	calcium channel blocker	Sigma	10.00	8.23	7.08	5.89	5.29
Doxepin	N06AA12	antidepressant	Sigma	8.32	8.12	8.33	8.09	7.74
Enalapril	C09AA02	angiotensin-converting enzyme inhibitor	Sigma	19.47	19.60	18.93	17.83	16.26
Eprosartan	C09CA02	angiotensin receptor antagonist	Sigma	95.33	110.52	108.18	98.62	90.53
Fluconazole	J02AC01	antifungal drug	Sigma	1.35	1.38	1.39	1.69	1.46
Fluoxetine	N06AB03	antidepressant	Sigma	1.90	1.83	1.78	2.09	2.17
Gabapentin	N03AX12	anticonvulsant	Pfizer	207.05	220.15	233.59	263.94	292.05
Haloperidol	N05AD01	neuroleptic	Sigma	0.28	0.23	0.20	0.17	0.17
Irbesartan	C09CA04	angiotensin receptor antagonist	Sigma	158.53	151.11	143.03	133.41	122.33
Lamotrigine	N03AX18	anticonvulsant	Sigma	24.19	26.92	29.73	33.90	35.92
Levetiracetam	N03AX14	anticonvulsant	Sigma	174.75	205.43	242.48	285.58	311.66
Losartan	C09CA01	angiotensin receptor antagonist	Fluka	18.82	17.25	20.46	28.62	30.71
Melperone	N05AD03	neuroleptic	TOCRIS bioscience	9.37	9.42	8.89	8.93	9.21
Metoprolol	C07AB02	beta blocker	Sigma	387.14	386.43	393.18	401.00	407.54
Mirtazapine	N06AX11	antidepressant	Sigma	12.63	14.24	15.44	16.53	17.28
Oxcarbazepine	N03AF02	anticonvulsant	Cerilliant	52.16	48.17	54.53	50.46	50.80
Paroxetine	N06AB05	antidepressant	Sigma	1.67	1.55	1.63	1.65	1.71
Pentoxifylline	C04AD03	vasodilating drug	Sigma	142.55	86.65	42.10	27.47	13.36
Pregabalin	N03AX16	anticonvulsant	Pfizer	34.34	37.35	43.66	45.62	45.31
Primidone	N03AA03	anticonvulsant	Fluka	29.71	28.24	28.82	27.71	25.11
Propafenone	C01BC03	antiarrhythmic agent	Sigma	9.58	9.52	8.85	8.50	7.79
Propranolol	C07AA05	beta blocker	Sigma	10.65	10.01	9.50	9.21	8.80

Table S 1 (continued): Selected Pharmaceuticals.

Analyte	ATC-Code	Drug class	Provider	Prescribed amounts provided from “AOK PLUS“ for the city Dresden (kg)				
				2008	2009	2010	2011	2012
Quetiapine	N05AH04	antipsychotic	Sigma	29.47	34.33	42.46	50.71	54.27
Ramipril	C09AA05	angiotensin-converting enzyme inhibitor	Hoechst AG	26.45	28.46	29.73	30.90	31.99
Sertraline	N06AB06	antidepressant	Sigma	19.98	19.21	19.11	19.93	19.86
Sotalol	C07AA07	antiarrhythmic agent	Sigma	9.32	7.54	6.35	5.35	4.69
Sulfamethoxazole	J01EE01	antibiotic	Sigma	46.60	45.35	43.23	39.58	32.90
Talinolol	C07AB13	beta blocker	LGC Standards	24.42	22.22	20.19	17.86	15.68
Telmisartan	C09CA07	angiotensin receptor antagonist	LGC Standards	15.78	16.88	18.02	17.67	16.77
Topiramate	N03AX11	anticonvulsant	Sigma	6.40	6.95	7.14	7.12	6.92
Torasemide	C03CA04	diuretic	Sigma	30.20	31.83	32.55	32.98	33.40
Tramadol	N02AX02	opioid analgesic	Sigma	73.63	69.32	64.78	63.51	59.83
Triamterene	C03BD02	diuretic	Sigma	7.90	7.45	6.37	5.67	4.95
Trimethoprim	J01EE01	antibiotic	Synopharm-fagron	9.71	9.38	8.93	8.23	6.90
Trimipramine	N06AA06	antidepressant	Sigma	18.52	17.07	17.38	17.00	16.59
Valsartan	C09CA03	angiotensin receptor antagonist	Sigma	210.21	242.29	284.60	308.55	346.86
Venlafaxine	N06AX16	antidepressant	Wyeth	29.24	32.07	37.97	45.24	51.21
Voriconazole	J02AC03	antifungal drug	Sigma	0.18	0.20	0.12	0.10	0.08

Table S 2: Mass spectrometric parameters for all analytes (precursor ion mass ($[M+H]^+$), product ion mass (PI), declustering potential (DP), collision energy (CE), cell exit potential (CXP), quantifier-qualifier-ratio (Q/Q)) as well as retention time (R_t), used internal standard (IS), linearity (R^2), lower (LLoQ) and upper limit of quantification (ULoQ).

Analyte	R_t (min)	$[M+H]^+$ [m/z]	DP	PI [m/z]	CE	CXP	Q/Q	IS	R^2	LLoQ ($\mu\text{g/L}$)	ULoQ ($\mu\text{g/L}$)
Amitriptyline	8.8	277.9	91	233.1 105.0	37 59	18 8	1.4	Amitriptyline d_3	0.9994	0.05	20
Atenolol	3.3	267.0	71	145.3 190.3	35 27	12 10	1.0	Levetiracetam d_6	0.9990	0.05	10
Bezafibrate	10.2	362.1	81	316.1 276.0	19 21	18 16	1.9	Warfarin	0.9992	0.05	20
Bisoprolol	6.0	326.3	81	116.3 74.3	45 17	6 16	5.8	Oxprenolol	0.9984	0.05	5
Candesartan	9.0	441.2	71	263.2 235.1	29 15	14 22	6.6	Amitriptyline d_3	0.9950	0.05	20
Carbamazepine	7.8	237.0	81	194.1 179.0	25 49	16 12	12.5	Carbamazepine d_{10}	0.9996	0.05	10
Carvedilol	8.2	407.3	126	100.2 224.2	41 31	18 20	1.7	Paroxetine d_6	0.9994	0.05	20
Celiprolol	5.4	380.3	96	251.2 307.2	31 25	20 8	0.9	Oxprenolol	0.9984	0.05	20
Citalopram	7.3	325.0	91	108.9 262.0	37 27	20 0	1.9	Citalopram d_6	0.9986	0.05	10
NCI	7.1	311.0	81	109.2 262.1	31 23	10 22	1.5	Citalopram d_6	0.9994	0.05	10
Clindamycin	5.6	425.0	86	126.1 377.2	39 27	8 10	12.7	Propranolol d_7	0.9992	0.05	10
Clozapine	6.8	327.0	86	269.9 192.0	31 59	16 12	2.9	Clozapine d_4	0.9998	0.05	20
NCL	6.3	314.0	56	271.1 193.1	33 55	22 16	1.3	Clozapine d_4	0.9982	0.05	5
Diltiazem	7.5	415.1	71	178.2 150.2	33 59	12 6	3.9	Carbamazepine d_{10}	0.9988	0.05	10
Doxepin	7.5	280.3	76	107.0 115.2	29 55	6 10	4.8	Doxepin d_3	0.9984	0.05	20
Enalapril	6.3	377.1	71	233.9 117.0	27 51	14 10	2.8	Propranolol d_7	0.9976	0.05	20
Eprosartan	6.5	425.1	96	135.0 107.1	45 67	12 8	1.5	Venlafaxine d_6	0.9998	0.05	20
Fluconazole	4.9	306.9	61	238.0 220.1	21 25	14 18	1.0	Oxprenolol	0.9986	0.05	20
Fluoxetine	9.2	310.0	46	44.1 148.1	41 13	8 14	2.2	Fluoxetine d_6	0.9986	0.05	20
NFL	8.9	296.2	36	134.1	11	12	-	Norfluoxetine d_6	0.9986	0.05	20
Gabapentin	3.6	172.2	51	137.2 154.1	23 19	6 14	0.5	Gabapentin d_{10}	0.9994	0.2	20
Haloperidol	7.8	376.0	106	165.0 123.0	33 59	16 10	1.7	Doxepin d_3	0.9994	0.05	20
Irbesartan	9.9	429.2	91	206.9 195.1	33 31	18 18	4.3	Trimipramine d_3	0.9990	0.05	20
Lamotrigine	4.8	255.9	81	211.0 145.0	37 53	18 10	2.2	Lamotrigine $^{13}\text{C}_4$	0.9984	0.05	20
Levetiracetam	3.5	171.1	41	126.1 154.2	19 11	22 14	1.1	Levetiracetam d_6	0.9988	0.2	20
Losartan	9.2	423.1	71	207.1 377.2	31 21	18 18	2.7	Trimipramine d_3	0.9988	0.05	20
Melperone	6.0	264.2	66	165.2 123.2	27 43	14 10	1.4	Venlafaxine d_6	0.9972	0.05	10
Metoprolol	4.9	268.0	61	115.9 74.0	27 35	10 6	2.0	Oxprenolol	0.9992	0.05	10

Table S 2 (continued): Mass spectrometric parameters for all analytes (precursor ion mass ($[M+H]^+$), product ion mass (PI), declustering potential (DP), collision energy (CE), cell exit potential (CXP), quantifier-qualifier-ratio (Q/Q)) as well as retention time (R_t), used internal standard (IS), linearity (R^2), lower (LLOQ) and upper limit of quantification (ULOQ).

Analyte	R_t (min)	$[M+H]^+$ [m/z]	DP	PI [m/z]	CE	CXP	Q/Q	IS	R^2	LLOQ ($\mu\text{g/L}$)	ULOQ ($\mu\text{g/L}$)
Mirtazapine	5.1	266.0	91	195.0 72.0	31 31	16 6	3.3	Tramadol $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$	0.9990	0.05	10
NMI	4.9	252.1	86	195.1 209.0	31 31	18 18	3.8	Tramadol $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$	0.9988	0.05	2
Oxcarbazepine	6.7	252.9	81	236.1 208.1	19 29	20 18	1.8	Carbamazepine d_{10}	0.9988	0.05	10
MHD	5.5	254.9	56	237.0 194.1	13 29	46 16	1.5	Oxprenolol	0.9994	0.1	10
Paroxetine	8.1	330.3	101	70.0 19.9	47 29	6 12	1.1	Paroxetine d_6	0.9994	0.05	20
Pentoxifylline	5.1	279.1	70	181.0 138.1	24 36	10 10	4.3	Doxepin d_3	0.9998	0.05	10
Pregabalin	3.6	160.1	46	97.3 55.1	21 31	6 10	0.8	Pregabalin d_6	0.9996	0.1	20
Primidone	4.7	219.1	66	162.1 91.2	17 35	12 8	1.7	Lamotrigine $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{N}_4$	0.9970	0.1	20
Propafenone	8.5	342.2	96	116.2 72.2	31 49	10 6	3.1	Amitriptyline d_3	0.9992	0.05	20
Propranolol	6.5	260.0	76	116.1 183.1	25 25	8 10	1.5	Propranolol d_7	0.9994	0.05	10
Quetiapine	7.0	384.0	86	253.0 221.0	31 49	16 18	3.3	Quetiapine d_8	0.9984	0.05	10
Ramipril	8.0	417.2	71	234.0 116.9	29 51	20 8	4.8	Carbamazepine d_{10}	0.9994	0.05	20
Sertraline	9.4	307.1	46	276.1 158.9	17 33	16 12	2.0	Fluoxetine d_6	0.9982	0.05	20
Sotalol	3.3	273.0	61	213.1 133.1	27 37	18 12	1.1	Levetiracetam d_6	0.9992	0.05	10
Sulfamethoxazole	5.7	253.9	66	156.1 92.1	23 37	10 6	1.5	Sulfamethoxazole $^{13}\text{C}_6$	0.9988	0.05	5
Talinolol	6.3	364.2	76	308.3 100.2	25 33	18 18	2.3	Venlafaxine d_6	0.9990	0.05	5
Telmisartan	10.1	515.3	161	497.3 276.1	45 61	14 24	1.2	Telmisartan d_3	0.9986	0.05	10
Topiramate	6.9	356.9	46	264.0 282.0	21 17	16 16	1.5	Quetiapine d_8	0.9976	0.05	20
Torasemide	6.4	349.1	61	263.9 289.9	21 19	16 18	3.4	Propranolol d_7	0.9998	0.05	20
Tramadol	4.9	264.1	51	58.3	37	10	-	Tramadol $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$	0.9988	0.05	5
Triamterene	4.2	254.0	101	237.1 104.1	37 53	20 8	2.6	Trimethoprim d_9	0.9986	0.05	10
Trimethoprim	4.1	291.0	86	230.1 261.0	33 35	14 14	1.3	Trimethoprim d_9	0.9978	0.05	10
Trimipramine	9.1	295.0	71	100.1 208.0	23 33	8 12	13.2	Trimipramine d_3	0.9988	0.05	10
Valsartan	10.5	463.2	66	291.0 235.0	23 23	18 22	1.0	Valsartan d_9	0.9972	0.1	40
Venlafaxine	5.9	278.5	46	58.0 260.1	47 17	10 16	1.2	Venlafaxine d_6	0.9996	0.05	20
ODV	4.5	264.0	66	58.2 107.1	45 39	4 8	6.2	Trimethoprim d_9	0.9998	0.05	10
Voriconazole	9.2	350.0	51	281.0 127.1	23 47	16 8	1.4	Warfarin	0.9992	0.05	5

Table S 3: Mass spectrometric parameters and retention time for all IS (precursor ion mass ($[M+H]^+$), product ion mass (PI), declustering potential (DP), collision energy (CE), cell exit potential (CXP), quantifier-qualifier-ratio (Q/Q)) and retention time (R_t).

IS	R_t (min)	$[M+H]^+$ [m/z]	DP	PI [m/z]	CE	CXP	Q/Q
Amitriptyline d ₃	8.8	281.1	66	233.1 117.2	23 31	20 10	1.5
Carbamazepine d ₁₀	7.7	247.2	81	204.2 187.2	29 51	18 16	23.2
Citalopram d ₆	7.3	331.1	76	109.2 262.1	35 29	10 16	1.9
Clozapine d ₄	6.7	331.1	76	272.2 192.1	31 59	16 16	2.1
Doxepin d ₃	7.5	283.2	71	107.2 77.2	31 75	18 6	3.6
Fluoxetine d ₆	9.2	316.2	56	44.2 154.2	33 13	8 14	3.2
Gabapentin d ₁₀	3.6	182.2	46	147.3 164.3	25 21	14 14	0.4
Lamotrigine ¹³ C, ¹⁵ N ₄	4.8	262.8	91	216.0 46.1	37 63	18 6	1.3
Levetiracetam d ₆	3.5	177.1	41	132.2 69.2	21 41	12 6	7.2
Norfluoxetine d ₆	8.8	302.2	46	140.2	11	12	-
Oxprenolol	5.7	266.2	56	116.1 225.2	25 19	10 40	1.2
Paroxetine d ₆	8.1	336.1	76	198.3 76.2	31 49	18 14	1.0
Pregabalin d ₆	3.6	166.1	51	58.2 103.3	33 23	10 8	0.5
Propranolol d ₇	6.7	266.9	66	116.2 189.2	27 25	10 16	1.2
Quetiapine d ₈	7.0	392.2	81	258.3 226.2	33 51	14 20	2.8
Sulfamethoxazole ¹³ C ₆	5.7	260.0	71	162.0 98.1	23 37	14 18	1.5
Telmisartan d ₃	10.1	518.2	121	500.3 279.3	47 61	12 26	1.4
Tramadol ¹³ C, d ₃	4.9	268.0	46	58.2	33	10	-
Trimethoprim d ₉	4.1	300.3	96	234.2 263.9	33 35	20 24	1.6
Trimipramine d ₃	9.1	298.2	56	130.2 61.2	25 47	8 4	2.2
Valsartan d ₉	10.4	445.0	76	300.2 235.0	25 25	26 22	1.0
Venlafaxine d ₆	5.9	284.2	46	64.2 121.2	37 33	4 10	4.8
Warfarin	10.6	309.1	71	163.1 251.1	19 25	14 22	1.7

Table S 4: Evaluation of the recovery (RE) and matrix effect (ME) for the spiking of 500 and 5000.

Analyte	Urine				Influent				Effluent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME
Amitriptyline	94.7%	-8.3%	90.0%	-6.7%	69.5%	-18.2%	74.7%	-19.1%	81.0%	-9.2%	88.4%	-12.2%
Atenolol	71.6%	-20.9%	71.7%	-23.0%	53.9%	-35.8%	61.3%	-37.9%	56.3%	-8.9%	57.6%	-10.5%
Bezafibrate	80.2%	3.7%	88.2%	-5.7%	85.5%	7.8%	83.9%	2.4%	75.2%	-5.9%	78.2%	-1.8%
Bisoprolol	92.6%	6.6%	96.9%	2.0%	93.8%	-8.5%	92.9%	-3.9%	91.6%	-5.2%	89.0%	-3.9%
Candesartan*	72.2%	-6.3%	81.7%	-12.6%	-	-	65.9%	2.1%	-	-	74.5%	-5.5%
Carbamazepine*	89.3%	-6.2%	92.1%	-6.8%	-	-	87.2%	-4.3%	-	-	87.2%	-5.4%
Carvedilol	83.5%	-12.1%	83.9%	-14.2%	57.8%	-29.1%	65.2%	-31.8%	67.9%	-18.9%	75.2%	-15.3%
Celiprolol	96.1%	11.8%	100.2%	-0.2%	76.2%	21.2%	93.2%	1.7%	95.5%	12.6%	87.6%	2.5%
Citalopram	97.2%	-9.7%	96.1%	-10.4%	81.9%	-19.2%	84.2%	-20.4%	86.1%	-8.0%	88.6%	-11.5%
NCI	90.6%	-10.8%	93.6%	-11.7%	78.1%	-26.1%	84.7%	-23.4%	91.7%	-17.6%	91.3%	-12.8%
Clindamycin	94.9%	1.5%	87.0%	6.5%	83.1%	-12.5%	86.7%	-12.0%	86.0%	-11.0%	90.0%	-6.5%
Clozapine	88.1%	-28.4%	80.8%	-21.2%	65.4%	-33.9%	75.0%	-37.2%	80.9%	-27.7%	77.1%	-14.7%
NCL	84.7%	-31.1%	86.6%	-27.3%	64.8%	-43.0%	75.2%	-45.2%	80.6%	-31.4%	84.7%	-25.3%
Diltiazem	94.6%	-3.6%	91.7%	-3.1%	78.2%	-5.9%	84.7%	-9.7%	82.8%	-2.2%	87.1%	-6.1%
Doxepin	96.7%	-3.1%	90.8%	-3.5%	77.2%	-6.8%	81.7%	-13.2%	89.4%	-4.2%	85.3%	-7.0%
Enalapril	94.5%	8.9%	94.8%	4.7%	84.7%	3.1%	93.3%	-3.8%	89.4%	2.1%	88.4%	1.1%
Eprosartan*	88.7%	-1.3%	87.2%	-6.1%	-	-	91.0%	-22.4%	-	-	92.5%	-11.9%
Fluconazole	95.6%	-1.5%	91.0%	-1.8%	82.2%	-8.9%	91.8%	-13.2%	92.6%	-4.0%	91.1%	-5.2%
Fluoxetine	87.2%	-10.8%	84.5%	-10.0%	49.2%	-35.0%	56.6%	-35.2%	66.8%	-12.3%	66.2%	-10.0%
Norfluoxetine	82.8%	-11.1%	80.7%	-9.0%	47.3%	-33.4%	53.6%	-35.9%	62.9%	-9.0%	65.9%	-9.2%
Gabapentin*	66.2%	47.8%	58.5%	29.2%	-	-	28.8%	10.0%	-	-	42.9%	19.6%
Haloperidol	91.7%	-15.5%	93.3%	-15.2%	70.6%	-16.4%	75.7%	-21.3%	84.7%	-7.4%	88.7%	-15.8%
Irbesartan*	73.8%	-8.2%	81.8%	-12.6%	-	-	64.8%	-25.4%	-	-	79.2%	-20.4%
Lamotrigine*	87.7%	-23.0%	92.7%	-24.2%	-	-	87.3%	-35.7%	-	-	94.7%	-22.5%
Levetiracetam ⁺	78.6%	33.0%	80.2%	13.1%	-	-	64.5%	-16.1%	74.0%	6.8%	78.7%	6.6%
Losartan	75.1%	-3.4%	77.7%	-5.7%	63.3%	-12.3%	66.1%	-16.1%	66.2%	-8.9%	70.6%	-11.0%
Melperone	92.3%	-5.3%	94.2%	-4.2%	85.0%	-8.2%	89.6%	-8.1%	90.5%	-5.0%	89.5%	-0.1%
Metoprolol*	95.9%	-4.3%	92.8%	2.4%	-	-	91.9%	-22.5%	-	-	92.8%	-16.5%

*Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the matrix effect and recovery for the spiking of 500 was not possible

⁺ Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the matrix effect and recovery for the spiking of 500 was not possible

Table S 4 (continued): Evaluation of the recovery (RE) and matrix effect (ME) for the spiking of 500 and 5000.

Analyte	Urine				Influent				Effluent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME
Mirtazapine	81.9%	-22.5%	77.1%	-15.5%	78.5%	-21.6%	87.8%	-27.7%	81.6%	-23.9%	79.6%	-17.7%
NMI	88.6%	-24.6%	81.2%	-18.4%	79.3%	-37.0%	88.2%	-36.1%	84.1%	-34.2%	85.3%	-27.0%
Oxcarbazepine	90.6%	3.3%	91.8%	6.1%	89.8%	-3.5%	85.8%	7.0%	97.6%	-8.3%	92.0%	-2.2%
MHD	90.1%	14.4%	92.1%	15.0%	89.5%	1.1%	87.9%	7.2%	89.9%	7.5%	92.3%	3.6%
Paroxetine	86.9%	-6.9%	89.1%	-12.2%	59.2%	-21.4%	67.8%	-28.3%	78.4%	-12.1%	82.5%	-13.9%
Pentoxifylline	96.4%	18.4%	91.2%	11.7%	87.1%	12.3%	92.3%	-0.6%	86.4%	10.7%	90.5%	1.0%
Pregabalin*	44.8%	25.3%	43.7%	26.2%	-	-	29.2%	8.7%	-	-	27.4%	12.0%
Primidone	88.0%	15.9%	95.4%	9.3%	86.8%	-2.3%	93.7%	-3.0%	92.6%	5.0%	90.0%	7.6%
Propafenone	90.0%	-4.2%	91.7%	-5.6%	73.2%	-10.2%	81.2%	-12.3%	81.2%	-7.7%	86.2%	-7.7%
Propranolol	92.3%	-3.8%	95.5%	-5.8%	82.8%	-12.5%	92.2%	-16.8%	84.1%	-6.3%	92.9%	-9.0%
Quetiapine	84.7%	-12.6%	88.9%	-8.0%	74.6%	-17.7%	82.8%	-18.2%	83.4%	-18.3%	86.0%	-9.5%
Ramipril	91.4%	4.7%	94.0%	-3.8%	81.9%	-0.9%	87.5%	-10.1%	85.7%	-1.0%	88.3%	-5.5%
Sertraline	84.2%	-8.8%	85.2%	-10.2%	49.2%	-35.1%	56.6%	-38.4%	75.8%	-15.1%	73.5%	-10.8%
Sotalol	83.9%	-21.0%	85.3%	-16.3%	71.7%	-41.3%	76.9%	-41.1%	69.9%	-13.7%	73.9%	-13.3%
Sulfamethoxazole	67.7%	27.3%	75.5%	13.2%	73.1%	8.0%	70.9%	3.7%	71.8%	3.8%	69.7%	2.2%
Talinolol	90.3%	-6.9%	94.8%	-3.2%	92.9%	-24.1%	88.5%	-13.2%	94.3%	-15.2%	91.7%	-11.8%
Telmisartan*	70.8%	-23.4%	70.8%	-21.0%	-	-	48.6%	-47.4%	-	-	51.3%	-23.0%
Topiramate	90.0%	27.4%	94.1%	8.4%	92.0%	15.4%	89.9%	9.5%	91.3%	11.1%	90.6%	5.1%
Torasemide	88.8%	19.6%	89.0%	5.7%	89.4%	9.9%	87.6%	-3.9%	91.4%	11.6%	90.6%	-0.9%
Tramadol	95.3%	-12.4%	96.1%	-11.1%	85.7%	-24.6%	92.6%	-24.1%	91.0%	-8.5%	88.2%	-5.9%
Triamterene	92.3%	-38.9%	91.9%	-39.1%	83.4%	-39.5%	89.7%	-41.2%	90.0%	-22.1%	89.7%	-20.1%
Trimethoprim	92.1%	-39.8%	95.4%	-40.3%	87.3%	-36.9%	89.6%	-35.1%	92.9%	-16.8%	90.7%	-14.8%
Trimipramine	92.1%	-7.0%	91.2%	-7.6%	68.8%	-21.2%	72.6%	-20.0%	84.4%	-10.0%	91.8%	-14.7%
Valsartan*	62.4%	-2.6%	68.2%	-11.6%	-	-	70.7%	13.4%	-	-	66.6%	-8.9%
Venlafaxine	96.9%	-2.6%	93.8%	-7.4%	81.8%	-0.5%	91.4%	-12.0%	91.0%	-2.4%	90.6%	-4.3%
ODV	93.6%	-37.5%	90.4%	-31.5%	89.7%	-27.1%	88.3%	-23.6%	96.7%	-11.6%	99.3%	-14.8%
Voriconazole	85.1%	4.4%	89.5%	0.5%	81.8%	3.9%	88.9%	-1.2%	83.4%	2.7%	88.4%	-2.8%

*Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the matrix effect and recovery for the spiking of 500 was not possible

† Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the matrix effect and recovery for the spiking of 500 was not possible

Table S 5: IntraDay Accuracy and RSD for the spiking of urine, effluent and influent samples with a concentration of 500 and 5000 ng/L.

Analyte	Urine				Effluent				Influent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)
Amitriptyline	101.9	2.88	100.3	2.06	96.3	2.64	101.0	2.83	93.6	6.68	99.4	6.15
Atenolol	99.8	3.20	94.6	5.79	120.6	5.15	111.0	2.88	105.2	5.79	101.9	1.61
Bezafibrate	116.6	12.01	98.5	4.60	100.7	3.08	107.9	4.15	100.5	2.24	104.8	3.91
Bisoprolol	104.1	8.81	95.8	4.92	95.4	3.21	78.7	6.47	93.7	5.51	87.1	6.44
Candesartan*	118.3	21.24	96.3	10.49	-	8.29	94.6	9.20	-	6.87	107.5	8.08
Carbamazepine*	103.3	3.31	97.9	1.46	-	4.39	93.9	2.61	-	3.49	102.0	4.88
Carvedilol	97.1	13.22	97.7	2.30	95.2	4.52	93.4	7.32	104.7	5.46	100.3	4.54
Celiprolol	100.8	1.51	97.9	6.79	95.9	2.39	89.0	5.86	93.0	3.19	96.9	7.43
Citalopram	101.3	1.82	95.2	4.10	101.8	3.19	93.5	3.40	104.2	5.60	96.0	1.02
NCI	106.7	3.69	99.5	4.12	108.4	5.13	97.4	5.28	109.3	7.75	97.6	3.84
Clindamycin	99.0	7.10	98.7	4.66	79.3	8.29	92.3	10.60	80.4	10.54	86.6	4.22
Clozapine	99.7	6.50	100.7	4.98	97.7	6.38	97.2	9.61	88.1	5.28	102.4	7.87
NCL	119.1	12.13	113.4	10.62	121.3	8.54	115.2	5.28	98.2	6.38	100.9	6.41
Diltiazem	99.5	5.82	101.3	3.44	96.2	7.29	95.8	3.34	85.5	3.36	95.1	7.69
Doxepin	100.5	3.81	98.3	3.22	94.0	2.33	97.9	4.04	97.8	3.22	95.8	4.46
Enalapril	101.1	7.48	94.3	1.63	101.2	5.00	95.4	3.87	91.4	2.71	95.4	6.69
Eprosartan*	99.3	5.83	97.1	2.85	-	5.91	84.2	5.54	-	1.69	87.8	6.22
Fluconazole	114.6	3.29	98.4	3.60	99.1	7.19	87.6	4.15	96.3	3.62	89.4	8.52
Fluoxetine	90.5	5.95	105.3	5.85	85.5	7.40	103.9	3.47	91.1	6.37	109.1	5.00
Norfluoxetine	88.2	2.93	103.8	6.89	83.2	5.18	97.4	5.35	83.7	4.99	101.0	5.41
Gabapentin*	102.8	9.67	96.6	5.35	-	5.01	95.9	6.16	-	7.71	115.5	5.70
Haloperidol	108.0	6.88	99.0	3.85	111.0	3.27	105.5	4.34	94.5	7.16	101.0	4.32
Irbesartan*	103.8	5.81	98.6	2.63	-	3.76	96.0	6.48	-	4.03	93.5	7.66
Lamotrigine*	99.4	6.03	100.1	2.53	-	10.44	102.6	5.03	-	6.98	107.7	7.14
Levetiracetam [†]	98.9	3.51	96.1	4.98	98.5	3.41	100.8	3.40	-	5.59	93.6	5.73
Losartan	107.6	8.81	99.0	3.03	100.3	5.54	96.9	7.52	112.2	9.37	101.2	8.45
Melperone	99.5	3.33	98.2	4.42	102.3	6.64	96.6	3.68	102.2	3.49	101.7	4.18
Metoprolol*	101.6	3.42	93.5	4.45	-	3.72	77.1	2.59	-	4.57	83.2	6.65

* Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the accuracy for the spiking of 500 was not possible

[†] Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the accuracy for the spiking of 500 was not possible

Table S 5 (continued): IntraDay Accuracy and RSD for the spiking of urine, effluent and influent samples with a concentration of 500 and 5000 ng/L.

Analyte	Urine				Effluent				Influent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)
Mirtazapine	89.6	8.11	91.9	10.44	95.0	3.43	96.3	3.50	112.2	1.62	99.8	5.33
NMI	109.0	7.78	110.6	6.67	108.7	2.47	96.3	11.03	111.2	3.55	104.7	1.15
Oxcarbazepine	100.4	12.19	97.0	3.07	97.9	3.98	84.4	5.52	94.1	8.29	84.9	4.24
MHD	88.6	7.62	96.0	5.22	89.8	2.75	80.6	5.75	91.0	4.17	91.2	11.39
Paroxetine	108.3	9.61	102.6	3.95	109.3	5.95	103.0	5.33	113.9	8.08	103.9	4.11
Pentoxifylline	101.4	5.27	99.1	2.03	92.8	4.55	89.0	4.08	100.0	6.09	93.8	8.14
Pregabalin*	108.1	4.78	100.6	4.47	-	5.38	85.6	6.58	-	10.28	96.4	8.31
Primidone	90.8	6.36	95.7	6.10	83.0	8.20	78.2	2.30	84.5	4.30	86.4	6.64
Propafenone	102.4	1.83	98.8	5.29	87.6	3.47	96.4	2.21	98.4	7.35	101.0	6.61
Propranolol	106.9	10.53	102.1	4.00	114.2	7.97	99.8	3.72	97.5	5.42	98.7	1.23
Quetiapine	97.6	5.03	91.6	5.59	95.4	8.65	91.3	2.53	84.3	8.32	93.0	3.87
Ramipril	100.2	5.70	99.2	3.39	98.1	2.88	90.4	1.96	90.5	2.40	94.2	3.52
Sertraline	105.8	7.90	104.9	5.22	122.3	5.25	111.8	2.67	110.0	8.91	102.6	5.81
Sotalol	101.2	5.45	95.6	5.61	121.8	1.88	114.4	3.89	103.8	9.53	94.8	6.15
Sulfamethoxazole	99.2	5.76	94.2	3.52	112.7	6.26	99.2	5.16	111.4	9.40	107.1	4.95
Talinolol	105.0	4.02	98.3	3.29	95.9	5.82	88.1	4.96	96.2	0.97	93.4	5.33
Telmisartan*	86.2	4.62	100.4	2.89	-	1.23	96.9	2.58	-	2.04	90.6	4.88
Topiramate	97.8	8.14	100.7	8.02	89.6	9.39	80.6	9.02	89.4	12.94	92.0	3.04
Torasemide	94.3	11.91	91.6	1.87	95.3	4.33	95.6	5.48	93.5	4.08	89.4	14.20
Tramadol	101.4	4.71	98.4	7.60	99.6	8.66	92.9	4.21	105.1	2.78	89.6	1.18
Triamterene	106.3	5.77	99.5	4.70	83.2	3.11	78.8	4.09	88.9	1.75	79.3	6.36
Trimethoprim	101.1	7.50	99.6	1.42	94.2	7.04	89.9	3.51	103.1	3.97	91.7	4.65
Trimipramine	110.4	7.30	104.8	5.07	102.2	2.59	103.3	4.26	99.2	5.44	98.7	3.13
Valsartan*	112.8	9.75	98.1	6.00	-	6.27	97.3	7.25	-	3.24	104.3	1.90
Venlafaxine	99.4	4.35	100.8	2.64	96.3	3.34	96.5	3.77	107.1	2.82	101.2	3.54
ODV	103.3	2.51	99.3	3.07	85.7	2.75	76.7	2.06	103.0	5.94	82.8	8.81
Voriconazole	105.1	13.44	104.3	7.77	107.7	4.88	108.4	2.93	108.0	3.95	102.3	6.91

*Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the accuracy for the spiking of 500 was not possible

* Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the accuracy for the spiking of 500 was not possible

Table S 6: InterDay accuracy and RSD for the spiking of urine, effluent and influent samples with a concentration of 500 and 5000 ng/L.

Analyte	Urine				Effluent				Influent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)
Amitriptyline	103.2	2.23	101.9	1.69	99.3	5.97	103.0	3.33	95.8	5.95	99.7	5.11
Atenolol	102.5	3.30	101.8	6.32	110.4	7.96	107.1	4.17	102.3	3.28	101.1	2.34
Bezafibrate	105.9	8.95	99.5	1.70	98.6	13.48	104.7	7.33	104.0	3.00	107.1	3.02
Bisoprolol	103.3	1.72	100.5	4.17	91.8	4.32	81.7	3.95	97.0	3.50	93.5	6.98
Candesartan*	101.7	14.28	95.2	3.17	-	-	97.5	3.97	-	-	112.0	3.89
Carbamazepine*	104.3	1.03	102.8	4.21	-	-	97.8	4.63	-	-	101.3	0.96
Carvedilol	98.1	3.32	95.9	3.59	95.7	11.42	97.8	12.01	105.3	14.30	99.9	7.69
Celiprolol	103.6	7.16	104.1	5.69	108.4	10.04	96.2	6.43	99.0	5.50	107.7	9.90
Citalopram	101.9	0.70	101.2	5.40	103.6	3.64	100.0	7.77	101.9	1.91	99.7	4.25
NCI	101.6	4.72	99.1	0.79	107.1	6.36	100.1	5.26	99.4	9.75	96.8	4.00
Clindamycin	98.7	0.65	96.1	4.94	81.6	2.42	87.7	5.31	81.2	2.30	84.2	2.60
Clozapine	101.8	4.15	100.4	0.27	102.0	3.80	105.5	8.86	96.0	7.65	104.4	6.35
NCL	110.5	9.52	105.6	6.39	115.9	5.72	108.5	5.54	104.0	6.84	96.0	5.24
Diltiazem	104.3	4.61	104.8	3.19	96.8	0.59	96.5	3.04	87.7	2.26	91.1	3.80
Doxepin	101.2	3.14	100.5	1.96	98.4	3.94	99.8	3.49	99.3	2.15	100.6	4.43
Enalapril	98.1	2.65	95.4	2.91	99.8	3.91	93.6	6.48	95.5	3.86	98.4	4.61
Eprosartan*	97.5	2.52	97.9	4.55	-	-	87.6	3.55	-	-	86.7	2.52
Fluconazole	106.9	6.64	101.2	2.51	99.6	1.02	92.7	4.79	91.6	4.47	92.9	5.23
Fluoxetine	96.8	6.22	102.3	2.80	97.6	10.85	101.4	3.44	94.4	3.60	102.1	6.06
Norfluoxetine	93.4	5.19	99.2	4.04	95.1	12.21	97.2	5.17	94.5	12.95	96.8	3.80
Gabapentin*	96.9	5.37	99.1	2.14	-	-	105.1	15.52	-	-	104.3	9.42
Haloperidol	103.4	4.15	100.8	2.49	112.1	2.55	108.2	5.70	97.3	6.01	101.6	5.49
Irbesartan*	98.8	4.56	95.8	2.59	-	-	92.1	5.17	-	-	91.1	3.43
Lamotrigine*	98.2	4.01	98.8	1.13	-	-	99.6	2.99	-	-	101.7	7.25
Levetiracetam ⁺	100.8	2.47	101.1	4.40	97.6	1.78	101.3	1.56	-	-	95.2	1.48
Losartan	101.8	4.98	97.1	2.10	95.6	13.18	94.1	6.38	108.2	13.34	102.8	3.46
Melperone	101.9	2.47	103.7	4.67	106.2	3.15	101.9	4.87	109.1	6.30	105.2	2.94
Metoprolol*	105.2	4.10	100.0	6.07	-	-	80.5	6.36	-	-	85.0	1.82

*Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the accuracy and RSD for the spiking of 500 was not possible

⁺ Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the accuracy and RSD for the spiking of 500 was not possible

Table S 6 (continued): InterDay accuracy and RSD for the spiking of urine, effluent and influent samples with a concentration of 500 and 5000 ng/L.

Analyte	Urine				Effluent				Influent			
	500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L		500 ng/L		5000 ng/L	
	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)	Acc (%)	RSD (%)
Mirtazapine	93.8	4.13	97.8	7.81	91.4	9.38	92.3	6.25	103.7	7.22	102.6	5.53
NMI	106.6	2.67	101.3	10.62	89.5	18.70	83.4	13.46	93.3	16.62	89.9	14.29
Oxcarbazepine	98.5	1.77	96.9	0.45	83.6	14.97	83.6	3.45	86.5	9.15	84.8	8.06
MHD	99.1	9.51	102.3	6.42	93.7	4.67	84.2	4.23	84.2	11.59	92.2	7.03
Paroxetine	102.3	5.16	100.8	3.81	105.4	9.04	103.6	9.96	107.8	13.27	101.8	4.69
Pentoxifylline	103.0	1.39	102.3	3.44	94.3	1.74	91.9	4.36	107.4	6.05	104.5	9.60
Pregabalin*	99.8	7.45	102.1	1.77	-	-	97.1	10.26	-	-	95.4	5.31
Primidone	95.7	4.49	94.6	2.02	81.2	6.66	80.1	4.49	84.6	3.61	89.6	8.70
Propafenone	103.4	0.94	102.1	2.79	97.1	9.66	101.8	5.58	106.3	7.30	108.7	6.86
Propranolol	105.8	3.85	103.1	4.08	111.6	8.60	102.3	6.01	99.1	3.09	100.6	5.74
Quetiapine	101.0	4.80	100.1	8.46	102.2	6.41	101.0	8.36	97.3	11.62	101.9	7.83
Ramipril	98.0	2.08	97.5	2.16	87.5	10.64	86.6	3.99	82.7	8.34	84.9	9.57
Sertraline	100.9	4.26	100.2	4.05	120.3	7.28	110.3	5.75	105.3	8.61	96.1	5.90
Sotalol	101.5	0.42	103.1	6.38	113.2	7.27	108.6	7.26	100.0	3.26	95.7	1.12
Sulfamethoxazole	98.1	3.92	98.2	3.67	107.9	5.04	101.0	3.29	100.9	9.07	100.9	5.32
Talinolol	103.3	1.39	99.5	2.03	93.5	5.66	86.2	2.93	94.7	4.11	88.8	7.10
Telmisartan*	92.9	9.66	101.3	0.87	-	-	99.8	2.88	-	-	91.6	1.15
Topiramate	99.2	3.62	99.6	3.96	92.4	2.93	89.5	8.81	104.5	13.32	103.8	10.34
Torasemide	95.9	2.13	93.4	5.47	97.4	3.38	94.4	5.59	96.4	2.75	93.4	5.58
Tramadol	104.4	2.56	100.0	2.31	99.8	4.31	94.6	5.85	103.3	8.73	93.0	5.16
Triamterene	103.9	2.10	101.9	4.70	84.0	4.77	82.0	7.94	89.1	11.81	86.5	11.28
Trimethoprim	102.1	0.89	101.7	3.20	98.0	9.62	91.9	9.18	100.8	11.24	96.5	8.22
Trimipramine	108.3	2.11	104.6	1.75	108.0	5.64	106.3	5.24	101.0	6.33	103.0	7.43
Valsartan*	101.8	9.42	95.4	2.67	-	-	96.6	5.24	-	-	106.3	9.55
Venlafaxine	100.5	4.61	101.6	1.53	99.5	4.67	101.1	3.95	107.4	2.41	104.0	2.37
ODV	105.3	1.79	104.0	4.41	86.0	7.42	85.5	9.29	108.0	4.65	96.6	12.39
Voriconazole	103.2	3.53	102.8	2.97	109.1	4.47	106.6	5.19	106.0	9.01	103.3	3.93

*Because of the high concentrations in the sewage sample, an evaluation of the accuracy and RSD for the spiking of 500 was not possible

† Because of the high concentrations in the influent sewage sample, an evaluation of the accuracy and RSD for the spiking of 500 was not possible

14.2 Artikel Nr. 2: „Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant”

Autoren: Robert Gurke^{a,b}, Martin Rößler^b, Conrad Marx^c, Sam Diamond^d, Sara Schubert^a, Reinhard Oertel^a, Joachim Fauler^a

^aInstitut für Klinische Pharmakologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, 01307 Dresden, Deutschland

^bForschungsverbund Public Health Sachsen und Sachsen-Anhalt, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 33, 01307 Dresden, Deutschland

^cInstitut für Siedlungs- und Industriewasserwirtschaft, Technische Universität Dresden, Bergstraße 66, 01069 Dresden, Deutschland

^dEnvironmental and Life Sciences, Trent University, Peterborough, Ontario K9J7B8, Kanada

Journal: Science of the Total Environment

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.067

Das Journal „Science of the Total Environment“ hat gegenwärtig (2015) einen Impact Factor von 4,099 und ist damit nach dem aktuellen Journal Citation Report® in der Kategorie „Environmental Sciences“ auf Position 18 (von 221) gelistet.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant



Robert Gurke^{a,b,*}, Martin Rößler^b, Conrad Marx^c, Sam Diamond^d, Sara Schubert^a, Reinhard Oertel^a, Joachim Fauler^a

^a Institute of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, D-01307 Dresden, Germany

^b Research Association Public Health Saxony and Saxony Anhalt, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 33, D-01307 Dresden, Germany

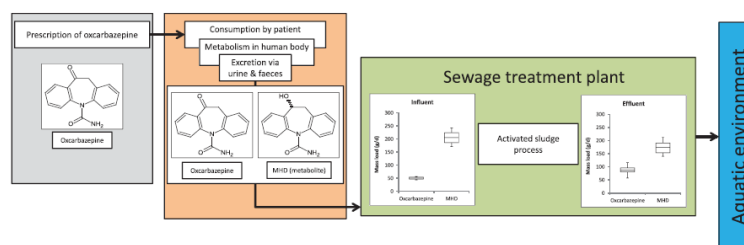
^c Institute of Urban Water Management, Technische Universität Dresden, Bergstraße 66, D-01069 Dresden, Germany

^d Environmental and Life Sciences, Trent University, Peterborough, Ontario K9J7B8, Canada

HIGHLIGHTS

- Ten days of monitoring for 49 pharmaceuticals and 7 metabolites in urban sewage
- 41 (influent) and 42 (effluent) analytes were detectable in all sewage samples.
- Only five compounds were removed with a rate higher than 50% during treatment.
- Five compounds had a significantly higher mass load in effluent than in influent.
- Metabolites are an important class of pharmaceutical residues.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2015

Received in revised form 17 June 2015

Accepted 17 June 2015

Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Pharmaceuticals

Metabolites

Sewage

Removal rate

Mass flow analysis

ABSTRACT

The present study determines removal rates (RR) of 56 pharmaceuticals and metabolites, respectively, in an urban sewage treatment plant using mass flow analysis by comparing influent and effluent loads over a consecutive ten-day monitoring period. Besides well investigated compounds like carbamazepine and metoprolol, less researched targets, such as topiramate, pregabalin, telmisartan, and human metabolites of pharmaceuticals were included. Another aim was to determine the ratio of pharmaceuticals and corresponding metabolites in raw wastewater.

Valsartan and gabapentin were detected at the highest average concentrations in influent ($c_{\text{val}} = 29.7 (\pm 8.1) \mu\text{g/L}$, $c_{\text{gab}} = 13.2 (\pm 3.3) \mu\text{g/L}$) and effluent ($c_{\text{val}} = 22.1 (\pm 5.1) \mu\text{g/L}$, $c_{\text{gab}} = 12.1 (\pm 2.6) \mu\text{g/L}$) samples. The comparison of mass loads in influent and effluent showed a significant removal ($p < 0.1$) for 20 compounds but only enalapril, eprosartan, losartan, pregabalin, and quetiapine were removed from the aqueous phase by more than 50%. Another 20 compounds were determined without significant difference and for five compounds (clindamycin, lamotrigine, oxcarbazepine, O-desmethyl venlafaxine, triamterene), a significant higher mass load in the effluent than in the influent was observed.

It has to be noticed that metabolites like 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (MHD) are found in higher mass loads than the corresponding parent compound in the sewage samples. Furthermore, metabolites and parent compound behave differently in the sewage treatment process. While MHD (RR = 15.1%) was detected with lower mass load in the effluent than in the influent, oxcarbazepine (RR = -73.2%) showed the contrary pattern.

* Corresponding author at: Institute of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 27, D-01307 Dresden, Germany.
E-mail address: robert.gurke@tu-dresden.de (R. Gurke).

When comparing expected and measured ratios of parent compound and metabolite in raw sewage, citalopram/N-desmethyl citalopram for example, showed good results. However, a major problem exists due to insufficient data regarding metabolism and excretion of many pharmaceuticals. This complicates the prediction of relevant metabolites and further efforts are needed to overcome this problem.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years many studies have focused on the quantification of pharmaceuticals in surface, ground, and drinking water (Huerta-Fontela et al., 2011; Mompelat et al., 2009; Valcárcel et al., 2011), and municipal sewage (Martínez Bueno et al., 2012; Metcalfe et al., 2010, 2003; Santos et al., 2010; Vieno et al., 2007) or evaluated toxicological effects of pharmaceuticals in the aquatic environment (Brausch et al., 2012; Fent et al., 2006; Kostich and Lazorchak, 2008). These studies focused primarily on compounds such as carbamazepine, sulfamethoxazole, trimethoprim, metoprolol or bezafibrate. Several pharmaceuticals like telmisartan (angiotensin receptor antagonist), quetiapine (antipsychotic), pregabalin, and topiramate (both anticonvulsants) or corresponding metabolites of pharmaceuticals were not investigated intensively enough, if at all (Petrovic, 2014) and at this time it is not possible to properly evaluate their environmental relevance (Besse et al., 2008; López-Serna et al., 2012; Petrie et al., 2014). Nevertheless, the fate of many pharmaceuticals post-ingestion, excretion and release into the sewer network has been extensively examined, especially concentrations in sewage treatment plant (STP) influent and effluent. Based on these studies, removal rates were calculated for many pharmaceuticals. The results indicate a compound specific removal rate. While some pollutants are removed completely from the aqueous phase, several of them are insufficiently or not removed while passing through the STP (Majewsky et al., 2011; Verlicchi et al., 2012). However, the removal rates were often determined by comparing results of grab or 24 h-composite samples of single days resulting in values with high uncertainty and variation (Petrie et al., 2014; Verlicchi et al., 2012). Majewsky et al. (2011) demonstrated that even considering the mean hydraulic retention time (HRT) of the wastewater in a STP and shifting the sampling period of the composite sample for influent and effluent sampling by this HRT is not an appropriate way to calculate the removal rates correctly. Ort et al. (2010) published a *Sampling Guide* indicating clearly that it is necessary to take flow-proportional composite samples of consecutive days especially when the aim of the study is to compare the loads at different locations (Ort et al., 2010).

The aim of this study was to calculate the removal rates of pharmaceuticals of different therapeutic classes and corresponding metabolites for the treatment in a STP. To ensure the determination of accurate removal rates, samples were taken on ten consecutive days and daily mass loads for influent and effluent were calculated and a mass flow analysis was applied over the whole monitoring period. The pharmaceuticals were selected based on regional prescription amounts. The prescription data were analyzed for the period from 2008 until 2012 for the city Dresden, Germany (Gurke et al., 2015). Due to technical limitations compounds not analyzable with reversed phase chromatography or positive electrospray ionization were excluded. Furthermore, relevant metabolites of the selected pharmaceuticals like O-desmethyl venlafaxine, N-desmethyl citalopram, 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine, and clindamycin sulfoxide were examined throughout the monitoring period. Based on a literature analysis and excretion rates expected ratios of pharmaceutical and corresponding metabolite were calculated and compared with the ratio determined in this study as well as in previous studies.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sampling

The STP Dresden Kaditz, Germany (740,000 inhabitant equivalent, sewage water of 55 million m³/year, hydraulic retention time of 24 h)

was selected for the monitoring program. The wastewater is mechanically treated by four coarse screens of 65 mm, three fine screens of 15 mm, a grit chamber with integrated fat trap and primary clarifiers with a total volume of 4800 m³. The plant was designed for biological nitrogen removal and chemical precipitation of phosphorus with a total tank volume of 112,000 m³. The secondary settling tanks have a total surface area of 10,920 m² and are equipped with submerged effluent pipes. For further information on the catchment area see Marx et al. (2015).

Samples were taken on ten consecutive days in January/February 2015 as flow-proportional 24-h composite samples from the influent, after the primary clarifier and from the effluent (Table S1). The automatic sampler (Endress + Hauser ASP Station 2000) took a sample volume of 25 mL per 480 m³ inflow and was equipped with 12 and 24 bottles, respectively. The total sample volume during dry weather is about 250–300 mL/h. The samples were retrieved from the automatic sampler at 8:00 AM, 50 mL was transferred into sterile 50 mL polypropylene centrifuge tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and stored at 4 °C in the dark until they were analyzed. Samples from Days 1, 2 and 3 were analyzed on Day 4, samples from Days 4, 5, 6 and 7 were analyzed on Day 8 and samples from Days 8, 9 and 10 were analyzed on Day 11 (February 5th, 2015).

2.2. Analytical method

Fifty-six pharmaceuticals and metabolites (Table 1) were analyzed in the different sewage samples using a method described elsewhere in detail (Gurke et al., 2015). Briefly, all samples were extracted by solid phase extraction (SPE) in duplicate using an Abimed ASPEC XL (Gilson, Middleton, WI, USA) with Oasis HLB 10 mg Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA, USA). Samples (1 mL) were adjusted to a pH of 3 by adding formic acid and spiked with an internal standard (IS) solution (Table S2). The elution was done using a mixture of methanol, deionized water and formic acid (90/9/1, v/v/v). The treatment of the eluates was slightly changed. Instead of evaporating the eluates to dryness, 25 µL DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added before the evaporation. After the evaporation, the remaining DMSO was filled up with 225 µL solvent A (97/3/0.05; v/v/v; 2 mM ammonium acetate solution/acetonitrile/formic acid). This change leads to a significant improvement especially for the polar analytes like pregabalin and gabapentin.

For the HPLC–MS/MS measurements a system, consisting of a Dionex–HPLC composed of an UltiMate3000 Pump and Autosampler (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany) with a Chromeleon Chromatography Data System (Dionex Softron, Idstein, Germany) and coupled to an API 4000 tandem mass spectrometer (AB Sciex, Framingham MA, USA) equipped with an electrospray ionization source (ESI), was used. All analytes were analyzed using positive ESI and an injection volume of 20 µL was selected. The chromatographic separation was performed with a Synergi 2.5u HydroRP 100A, 100 × 2.0 mm and a C18 security guard 4 mm × 2 mm (both Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The column temperature was held at 40 °C with a column oven (Shimadzu, Kyoto, Japan). The Analyst data system 1.6.2 (AB Sciex, Framingham MA, USA) was applied for MS control and MultiQuant 3.1 (AB Sciex, Framingham MA, USA) was used for the peak area evaluation, regression analysis of calibration curves and calculation of concentrations.

The LC–MS parameters of the metabolite clindamycin sulfoxide (Clearsynth, Mumbai, India) and the internal standard candesartan-d5

Table 1

List of investigated analytes (ODV: O-desmethyl venlafaxine, NFL: norfluoxetine, NCL: N-desmethyl clozapine, NCI: N-desmethyl citalopram, NMI: N-desmethyl mirtazapine, MHD: 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine).

Drug class	Analyte	Drug class	Analyte
ACE ^a inhibitor	Enalapril	Antidepressant	Mirtazapine
	Ramipril		NMI
Angiotensin receptor antagonist	Candesartan		Paroxetine
	Eprosartan		Sertraline
	Irbesartan		Trimipramine
	Losartan		Venlafaxine
	Telmisartan		ODV
	Valsartan	Antifungal drug	Fluconazole
Antiarrhythmic agent	Propafenone		Voriconazole
	Sotalol	Antipsychotic	Clozapine
Antibiotic	Clindamycin		NCL
	CLS		Quetiapine
	Sulfamethoxazole	Beta blocker	Atenolol
	Trimethoprim		Bisoprolol
Anticonvulsant	Carbamazepine		Carvedilol
	Gabapentin		Celiprolol
	Lamotrigine		Metoprolol
	Levetiracetam		Propranolol
	Oxcarbazepine		Talinolol
	MHD	Calcium channel blocker	Diltiazem
	Pregabalin	Diuretic	Torsemide
	Primidone		Triamterene
	Topiramate	Lipid-lowering drug	Bezafibrate
		Neuroleptic	Haloperidol
Antidepressant	Amitriptyline		Melperone
	Citalopram		Tramadol
	NCI	Opioid analgesic	Pentoxifylline
	Doxepin	Vasodilating drug	
	Fluoxetine		
	NFL		

^a Angiotensin-converting enzyme.

(Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Canada) were added to the analytical method and measured during the monitoring period. Mass spectrometric parameters and retention time can be found in the Supplementary data, Table S3.

Furthermore, the verification of the lower limit of quantification (LLOQ) resulted in lowered values (25 ng/L) for the analytes propranolol, propafenone, mirtazapine and N-desmethyl mirtazapine, melperone, quetiapine, and talinolol and in raised values (100 ng/L) for clindamycin, carvedilol, fluoxetine, sertraline and paroxetine. To consider possible degradation while in storage, the stability of the analytes was tested in spiked influent and effluent samples for a maximum storage time of seven days. Further information about the procedure can be found in the Supplementary data, Table S4.

2.3. Calculation of mass loads and removal rates

In order to examine the extent to which an analyte is removed from the aqueous phase while passing the sewage treatment plant, the removal rate (RR) was defined as:

$$RR = 1 - \bar{x}_E / \bar{x}_I \quad [1]$$

where \bar{x}_E and \bar{x}_I denote the 10-day average mass loads of the analyte measured in the effluent and influent, respectively. As the calculated removal rate may differ from zero by pure chance it was complemented by a statistical test. Since the assumption of normal distribution was rejected by the Shapiro–Wilk test for most of the data, a two-sided Wilcoxon rank-sum test (Rao et al., 2007) was applied. The Wilcoxon rank-sum test is based on the null hypothesis that the populations of the influent and the effluent sample are the same against the hypothesis that one of them tends to show larger values. A p-value smaller than 10% or 5%, respectively, was regarded as evidence against the null hypothesis. In addition, 90% confidence intervals of the estimated removal

rates were constructed in order to assess the precision of the point estimates. Since the distributions of the removal rates are unknown, confidence intervals were estimated by applying the nonparametric bootstrap method (Chernick, 2008). The estimation of each confidence interval is based on 1000 bootstrap replications.

3. Results and discussion

3.1. Determination of pharmaceuticals in sewage

The highest average concentrations were found in the influent for valsartan (29.7 (± 8.1) µg/L) followed by levetiracetam (12.5 (± 3.2) µg/L), gabapentin (13.2 (± 3.3) µg/L), and metoprolol (4.1 (± 1.0) µg/L). Comparing the concentrations found in the influent and in the samples taken after the primary clarifier, no significant difference was identifiable for any of the investigated analytes. In the effluent, the maximum average concentrations were determined for valsartan (22.1 (± 5.1) µg/L), gabapentin (12.1 (± 2.6) µg/L), and metoprolol (4.4 (± 0.9) µg/L). This order fits very well with values determined for influent and effluent samples in May and June 2014 for the same STP (Gurke et al., 2015).

Petrovic (2014) listed several analytes like pregabalin, quetiapine, topiramate, and telmisartan which have been included in only a few methods and limited data is available. Pregabalin (average conc. influent: 2.5 (± 0.6) µg/L, average conc. effluent: 1.1 (± 0.1) µg/L) and telmisartan (average conc. influent: 2.3 (± 0.7) µg/L, average conc. effluent: 1.3 (± 1.2) µg/L) were both determined with higher concentration and were detectable in the effluent samples of the STP so environmental release is evident. Topiramate was also detectable in all influent (average conc.: 0.24 (± 0.08) µg/L) and effluent samples (average conc.: 0.14 (± 0.05) µg/L), respectively, but the measured concentration was much lower than for the previously mentioned analytes. A positive determination of quetiapine was only possible in the influent (average conc.: 0.08 (± 0.02) µg/L) and in the samples after the primary clarifier (average conc.: 0.09 (± 0.02) µg/L). The concentrations in the effluent were always lower than the LLOQ.

The analytes carvedilol, diltiazem, fluoxetine, norfluoxetine, haloperidol, paroxetine, pentoxifylline, sertraline, trimipramine, and voriconazole were not detected within the monitoring period. Clindamycin and triamterene were only detectable in the effluent samples but not in the influent samples. Oertel et al. (2014) reported an average concentration for clindamycin in the influent of the same STP in Dresden Kaditz of 46 ng/L, which is below the LLOQ for the method used in this study. In addition, they reported a much higher concentration in the effluent, fitting very well with the concentrations determined within this study. For enalapril the concentrations found in the effluent were below the LLOQ but it was quantifiable in the samples of the influent as well as after the primary clarifier. Altogether, 41 pharmaceuticals and metabolites were detectable in all samples from influent and after the primary clarifier. Only talinolol was not detected on the second day of the monitoring caused by dilution due to an increased flow rate on this day. In the effluent 42 compounds were detectable in all taken samples. The mean, maximum and minimum concentrations as well as the LLOQ's of all analytes are given in Table S4. The strong fluctuations for the concentration of telmisartan (average conc. effluent: 1.3 (± 1.2) µg/L) and sulfamethoxazole (average conc. effluent: 0.2 (± 0.2) µg/L) in the effluent samples are conspicuous. Both compounds were quantified using a corresponding isotopically labeled internal standard (telmisartan d₃ and sulfamethoxazole ¹³C₆) and no anomaly was detectable for them, so a problem with the analytical method is very unlikely. Irregularities in the sampling and sample preparation are also very unlikely because all other analytes were not influenced.

Several pharmaceuticals are administered in so called fixed dose combinations (FDC) next to the application as monotherapy. For example sulfamethoxazole and trimethoprim are almost exclusively prescribed as FDC. Therefore, the ratio of both compounds should be constant in raw sewage. Marx et al. (2015) determined a theoretical

ratio between the concentration of sulfamethoxazole and trimethoprim in raw wastewater in the range of 1.25 and 3.13. While in the ten day monitoring period an average concentration ratio of $1.41 (\pm 0.21)$ was determined which fits very well in the expected range.

Because sampling and extraction on the same day wasn't possible due to organizational reasons the stability of the analytes had to be tested at least for the maximum planned storage time of four days. Data for the evaluation are displayed in the Supplementary data Fig. S1 and Fig. S2. It can be noted that most of the analytes are stable (concentration of Day X ($X = 1, 3, 6$) higher than 75% of concentration of Day 0) for the complete investigated period of seven days. Only clindamycin and the metabolite N-desmethyl mirtazapine had a concentration in the spiked influent sample lower than 75% of the Day 0 concentration after one day of storage. Altogether it can be noted that the stability is higher in effluent than in influent samples. For clozapine and its metabolite N-desmethyl clozapine, pentoxifylline, quetiapine, sertraline, telmisartan, trimipramine, and voriconazole the stability over a longer storage period (three days and longer; concentration at Day X below 75% of concentration of Day 0) at 4 °C for influent and effluent samples questionable and the same is true for amitriptyline, carvedilol, clindamycin, fluoxetine, norfluoxetine, haloperidol, mirtazapine, N-desmethyl mirtazapine, paroxetine, and propafenone but only in influent samples. In the case of levetiracetam and enalapril, the analyte was stable in influent but not in effluent samples when stored three days or longer.

The analytes clozapine and telmisartan have to be emphasized at this point. For both of them the determination of the mean concentration in the spiked effluent samples was burdened by a high standard deviation ($SD_{day0, telmi} = 39\%$, $SD_{day0, cloza} = 29\%$). Because the double extraction of each of the three daily subsamples (method details are described in the Supplementary data) showed similar results but the results of the three subsamples differed strongly, a problem with the SPE or the LC-MS system can be excluded. This assumption is supported by the fact that both analytes are quantified using a corresponding isotopically labeled standards and none of the IS showed irregularities

in the signal intensity. At this stage it is not possible to explain the observed abnormalities and the problematic has to be addressed in future studies.

3.2. Removal of pharmaceuticals in the sewage treatment process

Fig. 1 shows the concentration and mass load trend for the ten day sampling period for the analytes bezafibrate and oxcarbazepine. It clearly illustrates the necessity of a well-planned monitoring strategy that takes into account the possibility of fluctuating flow rates in the STP caused by rainfall events. Days 1 and 2 show a significantly increased flow rate while the flow rate stays constant from Day 3 until Day 10. The presented concentration and mass load profile of bezafibrate illustrate that the determined concentration and mass load stays constant after Day 4. Except for the antibiotics and antifungals all selected pharmaceuticals are mainly used for long term treatment of diseases and it can be expected that the daily mass load does not change considerably.

When comparing the mass loads in the influent and after the primary clarifier no significant differences are identifiable (Fig. 1, Fig. 2). Only fluconazole was determined with a statistically significant lower concentration ($RR = 13.0\%$, $p < 0.05$) at the second sampling point. Therefore, all further discussion will focus on influent and effluent samples. Fig. 2 illustrates the calculated mass loads for the 45 analytes detected in influent and/or effluent samples. Furthermore, mass loads determined in samples from May and June 2014 are displayed in the diagram. For most analytes the mass loads between the two different sampling campaigns are in good accordance. This confirms that the selected pharmaceuticals are used in a long-term treatment and have no seasonality. Only primidone showed a much higher mass load in the 2015 sampling, whereas talinolol was determined with much lower loads in 2015 compared to the samples from 2014. A possible explanation could be a changed prescription behavior. Previous studies recognized a decline in the yearly prescribed amount of talinolol in Dresden. The same trend but less intense was noted for primidone (Gurke et al., 2015).

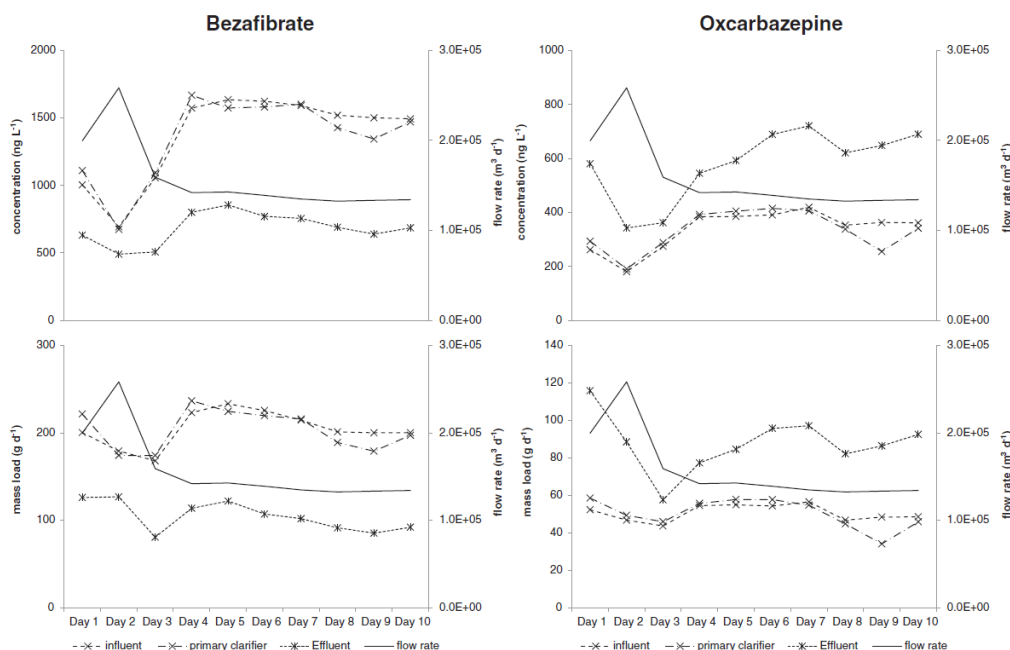


Fig. 1. Concentration and mass loads in influent, after primary clarification and in effluent of the STP Dresden Kaditz over a period of 10 days displayed for bezafibrate and oxcarbazepine.

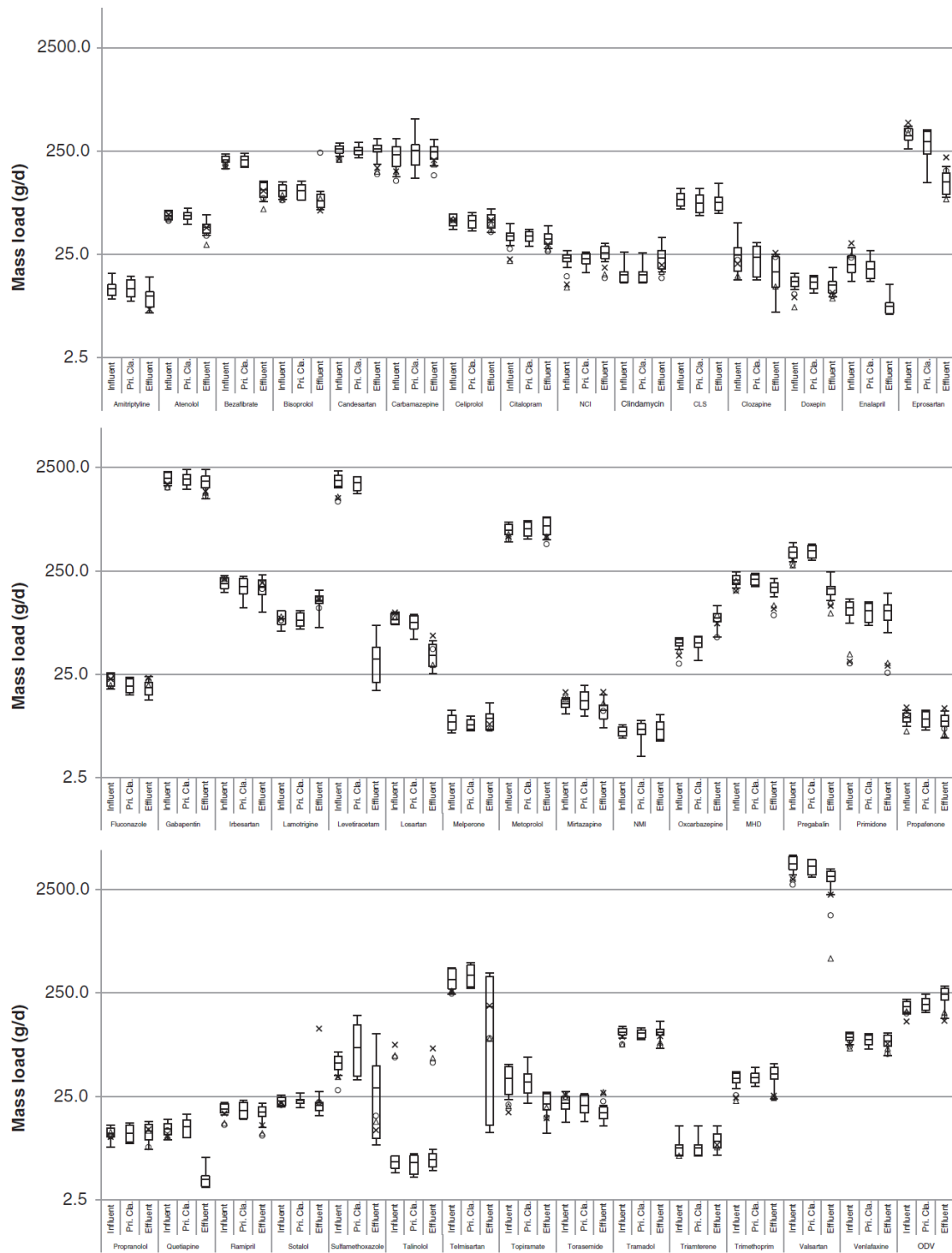


Fig. 2. Measured mass loads (on logarithmic Y axis) in samples taken from the influent, after the primary clarifier (Pri. Cla.) and in the effluent while in the ten day-monitoring period. Symbols mark the mass loads determined in May/June 2014 (x: May 11th; o: June 01st; Δ: June 23rd). In the case of clindamycin and tramterene the mass load values for influent and primary clarifier were calculated based on the LLoQ-values. In the case of enalapril and quetiapine the mass load for the effluent was calculated based on the LLoQ-values.

Therefore, a strong increase in the application frequency is very unlikely and other explanations have to be considered. Because of the different sampling seasons (2014: May and June, 2015: January) an influence of

temperature and consequently a higher stability at lower temperature in the sewer system is conceivable. For several other compounds like carbamazepine and valsartan the same trend is noticeable but much

less pronounced. Further investigations and the evaluation of the prescription data for 2014 and 2015 will help explain this effect.

As already described, STP's are not capable of completely removing pharmaceutical residues and metabolites from wastewater. However, removal rates are very compound specific (Fig. 3) and can vary widely between total elimination and significant release of compounds. Highest removal rates were determined for levetiracetam (RR = 98.1%), eprosartan (RR = 64.6%), and pregabalin (RR = 55.7%). In the case of enalapril and quetiapine no quantification of the analyte was possible in the effluent. The removal rate was calculated using mass loads based on the LLoQ for the analytes. Using this calculation, a removal rate higher than 60% and 67%, respectively, can be assumed. Overall, the investigations showed a statistically significant ($p < 0.05$ or $p < 0.1$) elimination of 20 compounds when comparing the mass load of influent and effluent samples. For further 20 analytes, no significant difference between the mass loads of influent and effluent was detectable. This includes for example candesartan, carbamazepine, metoprolol, and venlafaxine. Furthermore, five analytes were determined with a significantly higher mass load in the effluent than in the influent.

An increased load was notable for oxcarbazepine (RR = −73.2%), lamotrigine (RR = −51.8%), and the metabolite O-desmethyl venlafaxine (RR = −31.1%). These compounds are excreted in conjugated form as glucuronide after human metabolism (Garnett, 1997; Howell et al., 1993; Rouan et al., 1994; Schütz et al., 1986) and a deconjugation in the sewage treatment process can be expected (Verlicchi et al., 2012). As already described triamterene and clindamycin were only quantifiable in the effluent but not in the influent or after the primary clarifier. Considering the LLoQ for both components and calculating the mass load in the influent using this value for the calculation of the maximum load, a negative removal rate of analyte higher than −15% and −47%, respectively, has to be assumed.

Verlicchi et al. (2012) and Petrie et al. (2014) published comprehensive reviews about the behavior of frequently investigated pharmaceuticals while passing STP's and about the risk of these contaminants for the environment (Petrie et al., 2014; Verlicchi et al., 2012). Both reviews show clearly that an exact determination of removal rates is not possible

but rather a range can be defined. Petrie et al. (2014) defined the following ranges which will be adapted for the further description:

L	removal rate is <50%
M	removal rate is within 50–80%
H	removal rate is >80%

When using these criteria, 39 of the compounds investigated in this study have to be classified as having a low removal rate. Only five compounds (enalapril, eprosartan, losartan, pregabalin and quetiapine) are removed within a range of 50 to 80% and only one compound (levetiracetam) is removed with a RR higher than 80%. Many pharmaceuticals like bezafibrate, carbamazepine, metoprolol, sulfamethoxazole, and trimethoprim have been investigated in previous studies (Table 2). Comparing these values with the data determined within this study good concordance can be stated for most of the compounds.

Overall it has to be noticed that the calculated removal rates are only valid for the removal from the aqueous phase. All given values describe only elimination from or release into this phase. From the present results, it cannot be concluded whether the compounds are degraded/adsorbed or deconjugated/desorbed. To clarify the mechanism of removal/release further investigations including for example sewage sludge have to be conducted.

3.3. Human metabolites of pharmaceutical as residues in sewage water

When sewage, surface, ground or drinking water is tested for pharmaceutical residues metabolites are often not included. Several studies indicate clearly that considering metabolites when selecting the monitoring targets is necessary especially when the metabolites are active compounds (Besse et al., 2008; López-Serna et al., 2012). In this study the corresponding combinations clindamycin/clindamycin sulf-oxide (CLS), oxcarbazepine/10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine (MHD), citalopram/N-desmethyl citalopram (NCI), mirtazapine/N-desmethyl mirtazapine (NMI), clozapine/N-desmethyl clozapine (NCL), venlafaxine/O-desmethyl venlafaxine (ODV) as well as fluoxetine/norfluoxetine (NFL) were investigated. Fluoxetine and NFL were

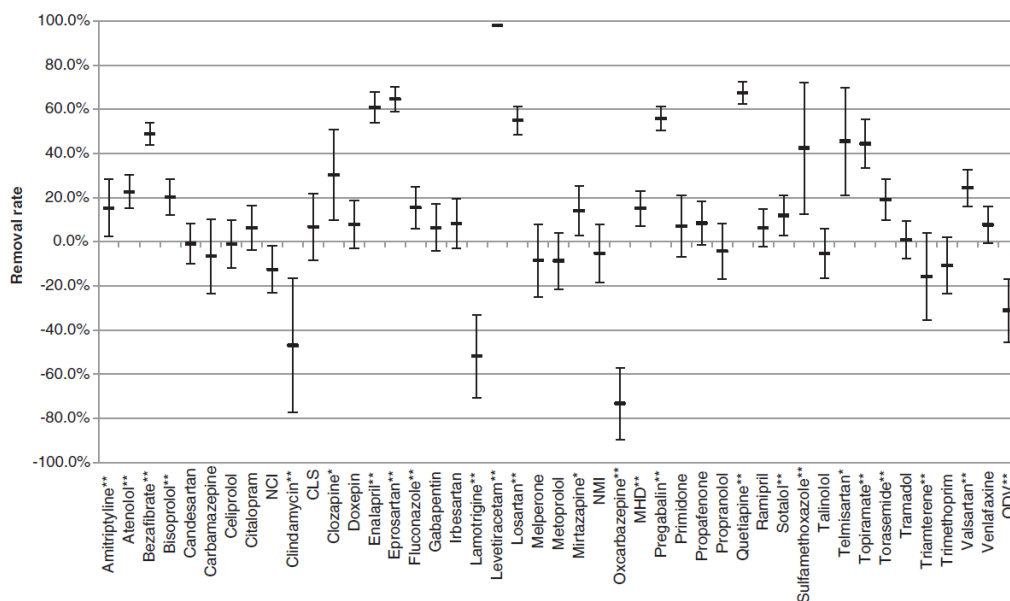


Fig. 3. Calculated removal rates (influent–effluent) and 90% confidence intervals based on mean values of influent and effluent mass loads of the ten-day monitoring period (** $p < 0.05$, * $p < 0.1$). In the case of clindamycin and triamterene the mass load values for the influent were calculated based on the LLoQ-values. In the case of enalapril and quetiapine the mass load for the effluent was calculated based on the LLoQ-values.

Table 2

Comparison of removal rates (RR) of selected analytes using the gathered data of Verlicchi et al. (2012) and Petrie et al. (2014) in comparison to the values determined within this study (L: RR < 50%, M: RR between 50 and 80%, H: RR > 80%).

Pharmaceutical	RR corresponding to		
	Verlicchi et al. (2012)	Petrie et al. (2014)	This study (RR)
Amitriptyline	–	M–H	L (15.3%)
Atenolol	L–M	M–H	L (22.6%)
Bezafibrate	L–H	L–M	L (48.8%)
Bisoprolol	L	–	L (20.3%)
Carbamazepine	L	L	L (–6.6%)
Gabapentin	H	L–H	L (6.4%)
Metoprolol	L	L–M	L (–8.6%)
Propranolol	L–M	–	L (–4.3%)
Sotalol	L	–	L (11.9%)
Sulfamethoxazole	L–H	L–M	L (42.4%)
Tramadol	L	L	L (0.9%)
Trimethoprim	L–H	L–M	L (–10.6%)
Valsartan	–	L–H	L (24.4%)
Venlafaxine	–	L	L (7.7%)

not detectable in any sample and will therefore not be discussed any further.

It is noticeable that when comparing the mass loads in influent and effluent the amount of MHD, ODV and CLS is always higher than the amount of the corresponding parent compound in all investigated sewage samples (Fig. 2). This illustrates clearly the importance to include metabolites in the target list when investigating sewage samples. It is also apparent that the behavior of the parent drug and the corresponding metabolite can differ strongly while in the sewage treatment process (Fig. 3). For example, the mass load of oxcarbazepine is significantly higher in the effluent than in the influent (RR = –73.2%). In contrast, the amount of MHD is lowered by 15.1% comparing influent and effluent. Similar differences were determinable for the combinations clindamycin/CLS and venlafaxine/ODV.

For the determination of relevant metabolites reliable studies on metabolism and excretion of every individual pharmaceutical are necessary. For example, in this context it has to be noted that data about the metabolism and excretion of clindamycin and its metabolites is sparse. Wynalda et al. (2003) stated, that clindamycin sulfoxide and N-desmethyl clindamycin are the two major bioactive metabolites

which are excreted via urine and feces (Wynalda et al., 2003). For the combination of clindamycin and CLS Oertel et al. (2014) determined the occurrence of the antibiotic and its metabolite in 142 influent as well as effluent sewage samples in a previous study (Oertel et al., 2014). They found average drug metabolite ratios of 7.5 and 2.8 in influent and effluent samples, respectively. In this study clindamycin wasn't quantifiable in the influent but in the effluent samples of the STP Dresden Kaditz and an average concentration ratio of 3.5 was determinable which is in good agreement with the previously published study.

Table 3 shows the excretion ratios for several pharmaceuticals and their corresponding metabolites in conjugated and non-conjugated form as well as the expected and measured concentration ratio of the compounds in raw sewage water. The expected ratio was calculated based on the metabolism and excretion ratios found in the literature. Furthermore, Table 3 shows ratios determined in other studies investigating raw wastewater. The best matching between measured and expected ratio and also ratios determined within other studies was found for citalopram and NCI. For Venlafaxine/ODV and mirtazapine/NMI the determined ratio of this and other studies is in good agreement but for both the expected ratios are higher than the determined ratios. In the case of oxcarbazepine the here determined ratio is between the results of two other studies but the difference is quite large. However, all of these ratios are within the expected ratio range, which, admittedly, is also quite large. The major problem in balancing human excretion of pharmaceuticals and their metabolites to the amount found in sewage is the limited amount of data available for the fate of drugs in humans. Especially the non-consideration of the proportion excreted with feces leads to considerable impairments. Furthermore, the metabolite could be less stable in raw sewage compared to the parent compound, and vice versa. This is for example true for clindamycin which is less stable in influent samples than its metabolite clindamycin sulfoxide (Fig. S1).

Furthermore, it has to be considered that several pharmaceuticals are applied as racemic mixtures containing equal amounts of the (R)- and (S)-enantiomer. For example mirtazapine is applied as racemic mixture (Fig. 4A). This is an important fact because the enantiomers can have different pharmaceutical efficacies and can also be metabolized in different ways (Szegedi and Schwertfeger, 2005). The information available on the metabolism and excretion of chiral analytes is even more limited than the information regarding the metabolism

Table 3

Excretion of pharmaceutical and corresponding metabolite and expected and measured ratio in raw sewage.

Pharmaceutical (PH)/corresponding metabolite (CM)	Excretion (Exc) in non-conjugated and conjugated form					Ratio (CM/PH) in raw sewage	
	PH	Conj.-PH	CM	Conj.-CM	Ref.	Expected ^c	Measured ^d (ref.)
Citalopram/N-desmethyl citalopram ^a	26%	12%	19%	0%	A	0.5–0.7	0.6 & 0.8 (J) 0.6 (K) 0.6 [this study]
Clozapine/N-desmethyl clozapine ^b	2.5%	3.1%	1.3–5.3%	0%	B,C,D	0.2–2.0	– ^e
Mirtazapine/N-desmethyl mirtazapine ^a	4%	25%	25–35%	0%	E,F	0.8–8.3	0.3 (L) 0.5 [this study] 4.7 (K) 37.0 (M) 2.2 (N) 4.7 [this study]
Oxcarbazepine/10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine ^a	0.6%	9%	26.9%	41.1–44.0%	G,H	2.8–119.1	2.3 & 2.0 (J) 2.0 (K) 2.0 (L) 5.8, 5.9 & 2.9 (O) 2.0 [this study]
Venlafaxine/O-desmethyl venlafaxine ^a	4.7%	0%	29.4%	26.4%	I	5.9–11.3	

Reference list: A) Dalgaard and Larsen (1999), B) Dain et al. (1997), C) Sheehan et al. (2010), D) Schaber et al. (1998), E) Szegedi and Schwertfeger (2005), F) Timmer et al. (2000), G) Schütz et al. (1986), H) Flesch et al. (2011), I) Howell et al. (1993), J) Metcalfe et al. (2010), K) Gurke et al. (2015), L) Lajeunesse et al. (2012), M) Kaiser et al. (2014), N) Ledercq et al. (2009), O) Rúa-Gómez and Püttmann (2012).

^a Urine.

^b Urine + feces.

^c $(CM/PH)_{exp} = (M_{CM} * Exc_{CM}) / (M_{PH} * Exc_{PH})$.

^d $(CM/PH)_{meas} = C_{CM}/C_{PH}$.

^e No study was found providing data for clozapine and the corresponding metabolite; N-desmethyl clozapine was not quantifiable in this study, so the ratio CM/PH was not calculated.

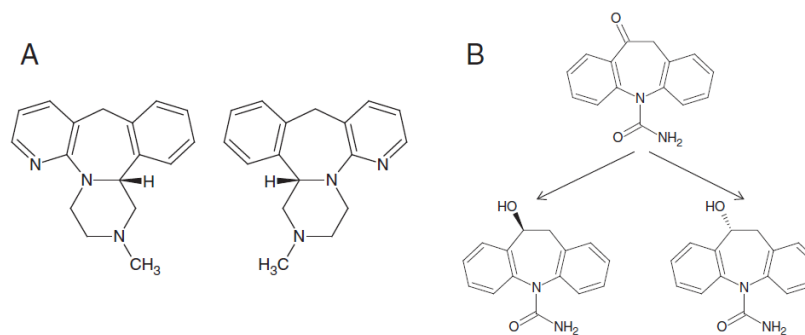


Fig. 4. A) (R)-enantiomer (left) and (S)-enantiomer (right) of mirtazapine (Szegedi and Schwertfeger, 2005); B) metabolism of oxcabazepine to the enantiomers (S)-MHD and (R)-MHD (Flesch et al., 2011).

and excretion of parent pharmaceuticals in general. Another example is oxcabazepine which is intensively metabolized to the active compound MHD (Fig. 4B). Thereby, a prochiral carbonyl group is reduced resulting in different amounts of (S)- and (R)-MHD.

It is expected that the behavior of the enantiomers during the wastewater treatment process and the ecotoxicological potential when released into the environment can also be different (Kasprzyk-Hordern, 2010; López-Serna et al., 2013). With the here presented method separation of enantiomers is not possible and further efforts are necessary to diminish the gaps in knowledge on the special topic of chiral pharmaceuticals and their behavior in the human body as well as in the sewage treatment process.

4. Conclusions

The results presented in this paper for the removal rates of targeted compounds during the wastewater treatment process are based on the mass load comparisons of influent and effluent over a period of ten days. The chosen approach in combination with the flow proportional sampling guarantees a high reliability of the results. The determined removal rates are a further confirmation that sewage treatment plants have not been designed to remove pharmaceutical residues from wastewater. Just a small number of analytes like levetiracetam and enalapril show high removal rates but most of the targets are only slightly eliminated from the aqueous phase and a few like lamotrigine and oxcabazepine were even detectable with significantly higher mass loads in the effluent than in the influent.

Furthermore several analytes which have not been investigated in previous study were included within this investigation. Telmisartan was quantified successfully in sewage samples from influent and effluent of the STP Dresden Kaditz. However, its determination in the effluent samples and within the stability analysis was problematic and further efforts are necessary to clarify the reasons for this issue. Further analytes with limited database like pregabalin, topiramate and quetiapine were detected in the sewage samples and removal rates were determined. In this context pregabalin is causing the greatest concern. Although its removal rate is higher than 50%, the detectable concentration in the effluent is still higher than 1 µg/L.

Another central concern of this study was the determination of pharmaceuticals and their corresponding human metabolites in the sewage treatment process. The ratios of clindamycin and CLS, venlafaxine and ODV as well as oxcabazepine and MHD where the mass load of the metabolites are always higher than that of the pharmaceutical compounds itself illustrate clearly the importance of considering metabolites when investigating the fate of pharmaceutical residues in the aquatic environment. Furthermore, pharmaceuticals and corresponding metabolite can behave totally different while in the sewage treatment process. While the amount of MHD is lowered, oxcabazepine can be detected with a significantly higher mass load in the effluent than in the influent.

The main critical issue in this context is the often insufficient database regarding the metabolism in the human body and the excretion ratio of the pharmaceutical and the corresponding metabolites in urine and feces. This requires attention not only by environmental researchers but also by pharmacologists in clinical examinations.

Acknowledgments

This study was conducted within the InnoMedTec project (Grant no. 100098212), which was funded by the European Social Fund (ESF) and the Free State of Saxony and the ANTI-Resist project (02WRS1272A) which was financed by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the initiative Risk Management of Emerging Compounds and Pathogens in the Water Cycle (RISKWa). We would also like to thank the Stadtentwässerung Dresden GmbH, especially R. Knoche and N. Lucke, for providing the samples from the STP. U. Mann and K. Weber (Institute of Clinical Pharmacology) are greatly appreciated for their help in analyzing the wastewater samples. Thanks to C. Metcalfe (Trent University) and M. Majewsky (Karlsruhe Institute of Technology) for the fruitful discussions. We also want to thank the reviewers for their time and the helpful comments which greatly improved the quality of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.067>.

References

- Besse, J.-P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: application to the French situation and preliminary prioritization. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 665–695. <http://dx.doi.org/10.1080/10807030802235078>.
- Brausch, J.M., Connors, K.A., Brooks, B.W., Rand, G.M., 2012. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 218, 1–99. <http://dx.doi.org/10.1007/97814614313741>.
- Chernick, M.R., 2008. *Bootstrap Methods: A Guide for Practitioners and Researchers*. 2nd ed. John-Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (9780471756217).
- Dain, J.G., Nicoletti, J., Ballard, F., 1997. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Metab. Dispos.* 25, 603–609.
- Dalgaard, L., Larsen, C., 1999. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acetyl- and N-glucuronides. *Xenobiotica* 29, 1033–1041. <http://dx.doi.org/10.1080/004982599238092>.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- Flesch, G., Czendlik, C., Renard, D., Lloyd, P., 2011. Pharmacokinetics of the monohydroxy derivative of oxcabazepine and its enantiomers after a single intravenous dose given as racemate compared with a single oral dose of oxcabazepine. *Drug Metab. Dispos.* 39, 1103–1110. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.109.030593>.
- Garnett, W.R., 1997. Lamotrigine: pharmacokinetics. *J. Child Neurol.* 12, 10–15. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073897012001041>.
- Gurke, R., Rossmann, J., Schubert, S., Sandmann, T., Rößler, M., Oertel, R., Fauler, J., 2015. Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most

- prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. *J. Chromatogr. B* 990, 23–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.008>.
- Howell, S.R., Husbands, G.E., Scatina, J.A., Sisenwine, S.F., 1993. Metabolic disposition of 14C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica* 23, 349–359. <http://dx.doi.org/10.3109/00498259309057023>.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* 45, 1432–1442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.036>.
- Kaiser, E., Prasse, C., Wagner, M., Bröder, K., Ternes, T.A., 2014. Transformation of oxcarbazepine and human metabolites of carbamazepine and oxcarbazepine in wastewater treatment and sand filters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10208–10216. <http://dx.doi.org/10.1021/es5024493>.
- Kasprzyk-Hordern, B., 2010. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4466–4503. <http://dx.doi.org/10.1039/c000408c>.
- Kostich, M.S., Lazorchak, J.M., 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci. Total Environ.* 389, 329–339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.008>.
- Lajeunesse, A., Smyth, S.A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C., 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* 46, 5600–5612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.042>.
- Leclercq, M., Mathieu, O., Gomez, E., Casellas, C., Fenet, H., Hillaire-Buys, D., 2009. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 408–415. <http://dx.doi.org/10.1007/s002440089202x>.
- López-Serna, R., Petrović, M., Barceló, D., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro river basin (NE Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 280–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.027>.
- López-Serna, R., Kasprzyk-Hordern, B., Petrović, M., Barceló, D., 2013. Multi-residue enantiomeric analysis of pharmaceuticals and their active metabolites in the Guadalquivir River basin (South Spain) by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, in: *analytical and bioanalytical. Chemistry* 5859–5873. <http://dx.doi.org/10.1007/s0021601369007>.
- Majewsky, M., Gallé, T., Bayerle, M., Goel, R., Fischer, K., Vanrolleghem, P. a., 2011. Xenobiotic removal efficiencies in wastewater treatment plants: residence time distributions as a guiding principle for sampling strategies. *Water Res.* 45, 6152–6162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.005>.
- Martínez Bueno, M.J., Gomez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2012. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environ. Pollut.* 164, 267–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.038>.
- Marx, C., Mühlbauer, V., Schubert, S., Oertel, R., Ahnert, M., Krebs, P., Kuehn, V., 2015. Representative input load of antibiotics to WWTPs: predictive accuracy and determination of a required sampling quantity. *Water Res.* 76, 19–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.049>.
- Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2872–2880. <http://dx.doi.org/10.1897/02469>.
- Metcalfe, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R., Andrews, D.M., 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 79–89. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.27>.
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>.
- Oertel, R., Schubert, S., Mühlbauer, V., Büttner, B., Marx, C., Kirch, W., 2014. Determination of clindamycin and its metabolite clindamycin sulfoxide in diverse sewage samples. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 11764–11769. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-2333-2>.
- Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A., 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6024–6035. <http://dx.doi.org/10.1021/es100779n>.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.
- Petrovic, M., 2014. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 1, e25–e33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2013.11.004>.
- Rao, C.R., Miller, J.P., Rao, D.C., 2007. *Handbook of Statistics: Epidemiology and Medical Statistics*. 27th ed. Elsevier.
- Rouan, M.C., Lecaillon, J.B., Godbillon, J., Menard, F., Darragon, T., Meyer, P., Jungers, P., Kourilsky, O., Hillion, D., Aldigier, J.C., 1994. The effect of renal impairment on the pharmacokinetics of oxcarbazepine and its metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47, 161–167. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00194967>.
- Rúa-Gómez, P.C., Püttmann, W., 2012. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 689–699. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0614-1>.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>.
- Schaber, G., Stevens, I., Gaertner, H.J., Dietz, K., Breyer-Pfaff, U., 1998. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46, 453–459.
- Schütz, H., Feldmann, K.F., Faigle, J.W., Kriemler, H.-P., Winkler, T., 1986. The metabolism of 14 C-oxcarbazepine in man. *Xenobiotica* 16, 769–778. <http://dx.doi.org/10.3109/00498258609043567>.
- Sheehan, J.J., Siwi, J.K., Amatniek, J.C., Grinspan, A., Canuso, C.M., 2010. Atypical antipsychotic metabolism and excretion. *Curr. Drug Metab.* 11, 516–525. <http://dx.doi.org/10.2174/138920010791636202>.
- Szegedi, A., Schwertfeger, N., 2005. Mirtazapine: a review of its clinical efficacy and tolerability. *Expert. Opin. Pharmacother.* 6, 631–641. <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.6.4.631>.
- Timmer, C.J., Sitsen, J.M., Delbressine, L.P., 2000. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.* 38, 461–474. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200038060-00001>.
- Valcárcel, Y., Alonso, S.G., Rodríguez-Gil, J.L., Maroto, R.R., Gil, A., Catalá, M., 2011. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere* 82, 1062–1071. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.041>.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment — a review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001–1012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.017>.
- Wynalda, M.A., Hutzler, J.M., Koets, M.D., Podol, T., Wienkers, L.C., 2003. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 31, 878–887. <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.31.7.878>.

Supplementary Data zu Artikel „Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant”

Table S1: Dates of monitoring and corresponding flow rates.

	Date		Flow rate (m ³ /day)
Day 1	Monday	26.01.2015	199,619
Day 2	Tuesday	27.01.2015	258,494
Day 3	Wednesday	28.01.2015	159,175
Day 4	Thursday	29.01.2015	142,003
Day 5	Friday	30.01.2015	142,821
Day 6	Saturday	31.01.2015	139,023
Day 7	Sunday	01.02.2015	134,894
Day 8	Monday	02.02.2015	132,452
Day 9	Tuesday	03.02.2015	133,424
Day 10	Wednesday	04.02.2015	134,224

Table S2: List of used Internal Standards.

Internal Standards		
Amitriptyline d3	Lamotrigine 13C,15N4	Sulfamethoxazole 13C6
Carbamazepine d10	Levetiracetam d6	Telmisartan d3
Candesartan d5	Norfluoxetine d6	Tramadol 13C,d3
Citalopram d6	Oxprenolol	Trimethoprim d9
Clozapine d4	Paroxetine d6	Trimipramine d3
Doxepin d3	Pregabalin d6	Valsartan d9
Fluoxetine d6	Propranolol d7	Venlafaxine d6
Gabapentin d10	Quetiapine d8	Warfarin

Table S3: Mass spectrometric parameters and retention time of clindamycin sulfoxide and candesartan d5 (precursor ion mass ([M+H]⁺), product ion mass (PI), declustering potential (DP), collision energy (CE), cell exit potential (CXP)).

Analyte/ Internal Standard	R _t (min)	[M+H] ⁺ [m/z]	DP	PI [m/z]	CE	CXP
Clindamycin Sulfoxide	4.4	441.2	66	126.1	45	12
				377.0	23	10
Candesartan d ₅	9.5	446.2	66	268.1	17	24
				207.1	35	18

Table S4: Lower limit of quantification (LLoQ), determined mean, maximum and minimum concentrations of all selected analytes while the ten day monitoring and calculated removal rate as well as corresponding p-values. The removal rates were calculated based on the daily mass loads in influent and effluent.

Drug class	Analyte	LLoQ (ng/L)	Influent concentration (ng/L)			Primary clarifier concentration (ng/L)			Effluent concentration (ng/L)			Removal rate	
			Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max		P-value
ACE ¹ inhibitor	Enalapril	50	136 (±48)	66	214	122 (±45)	53	200	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	> 60.7% **	< 0.01
	Ramipril	50	124 (±27)	68	155	121 (±29)	60	156	114 (±20)	78	143	6.4%	0.364
Angiotensin receptor antagonist	Candesartan	50	1723 (±358)	917	2045	1660 (±304)	957	1930	1716 (±303)	1158	1985	-0.8%	0.940
	Eprosartan	50	2372 (±664)	1008	3213	2024 (±761)	924	2833	801 (±154)	564	1044	64.6% **	< 0.01
	Irbesartan	50	1273 (±334)	602	1664	1162 (±319)	540	1569	1138 (±265)	632	1465	8.1%	0.406
	Losartan	50	567 (±133)	293	723	524 (±126)	279	658	246 (±49)	159	333	55.1% **	< 0.01
	Telmisartan	50	2274 (±749)	1000	3261	2488 (±814)	1162	3459	1298 (±1205)	56	2747	45.5% *	0.059
	Valsartan	100	29685 (±8105)	14639	38620	27880 (±7146)	14341	35933	22108 (±5070)	13993	28222	24.4% **	< 0.01
Antiarrhythmic agent	Propafenone	25	64 (±15)	39	79	61 (±17)	36	84	58 (±10)	38	69	8.4%	0.226
	Sotalol	50	150 (±33)	76	191	150 (±28)	84	177	131 (±19)	96	153	11.9% **	0.028
Antibiotic	Clindamycin	100	<LLoQ	<LLoQ	101	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	146 (±19)	126	180	< -47.0% **	< 0.01
	<i>CLS</i>	50	551 (±66)	414	644	499 (±62)	383	576	506 (±59)	436	610	6.8%	0.131
	Sulfamethoxazole	50	348 (±98)	191	476	503 (±335)	189	1091	208 (±222)	58	718	42.4% **	0.023
	Trimethoprim	50	246 (±55)	146	317	254 (±64)	120	341	272 (±74)	148	385	-10.6%	0.151
Anticonvulsant	Carbamazepine	50	1536 (±539)	815	2436	1218 (±615)	727	2831	1614 (±427)	1020	2309	-6.6%	0.496
	Gabapentin	200	13170 (±3323)	6442	16608	12935 (±3071)	7303	17774	12080 (±2572)	7651	15188	6.4%	0.406
	Lamotrigine	50	574 (±154)	295	762	559 (±147)	267	747	862 (±224)	446	1200	-51.8% **	< 0.01
	Levetiracetam	200	12505 (±3167)	6370	16193	11754 (±2482)	7033	14314	216 (±60)	129	308	98.1% **	< 0.01
	Oxcarbazepine	50	337 (±74)	181	419	333 (±75)	191	415	579 (±131)	343	721	-73.2% **	< 0.01
	<i>MHD</i>	100	1374 (±328)	662	1705	1373 (±285)	780	1677	1139 (±177)	823	1337	15.1% **	0.013
	Pregabalin	100	2544 (±622)	1288	3363	2583 (±584)	1417	3236	1087 (±119)	927	1242	55.7% **	< 0.01
	Primidone	100	725 (±164)	454	956	676 (±146)	450	876	665 (±148)	400	837	7.1%	0.326
	Topiramate	50	244 (±79)	174	364	233 (±100)	112	445	140 (±49)	69	201	44.4% **	< 0.01
Antidepressant	Amitriptyline	50	76 (±13)	54	96	77 (±18)	52	101	63 (±10)	51	80	15.3% **	0.049
	Citalopram	50	247 (±43)	183	293	249 (±54)	170	310	231 (±42)	165	303	6.3%	0.257
	<i>NCI</i>	50	151 (±30)	98	200	150 (±34)	91	193	168 (±25)	125	214	-12.6%	0.131
	Doxepin	50	90 (±17)	63	108	89 (±18)	60	112	81 (±11)	69	95	7.7%	0.174
	Fluoxetine	100	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-
	<i>NFL</i>	50	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-
	Mirtazapine	25	91 (±21)	45	114	101 (±25)	61	142	79 (±16)	58	102	14.0% *	0.096
	<i>NMI</i>	25	46 (±8)	32	58	48 (±10)	30	61	47 (±7)	39	61	-5.2%	1.000
	Paroxetine	100	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-
	Sertraline	100	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-
	Trimipramine	50	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-
	Venlafaxine	50	618 (±133)	337	765	586 (±131)	326	741	562 (±106)	389	681	7.7%	0.174
	<i>ODV</i>	50	1242 (±306)	630	1518	1288 (±311)	658	1704	1614 (±418)	894	2140	-31.1% **	< 0.01
	Fluconazole	50	146 (±30)	97	191	129 (±34)	68	167	123 (±27)	79	168	15.4% **	0.049
Antifungal drug	Voriconazole	50	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ	-	-

¹angiotensin-converting enzyme

²calcium channel

** p<0.05, *p<0.1

Table S4 (continued): Lower limit of quantification (LLOQ), determined mean, maximum and minimum concentrations of all selected analytes while the ten day monitoring and calculated removal rate as well as corresponding p-values. The removal rates were calculated based on the daily mass loads in influent and effluent.

Drug class	Analyte	LLOQ (ng/L)	Influent concentration (ng/L)			Primary clarifier concentration (ng/L)			Effluent concentration (ng/L)			Removal rate	
			Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max		P-value
Antipsychotic	Clozapine	50	162 (±79)	86	350	146 (±53)	92	220	113 (±51)	52	180	30.3% *	0.096
	<i>NCL</i>	50	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-
	Quetiapine	25	81 (±22)	41	111	85 (±24)	43	117	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	> 67.4% **	< 0.01
Beta blocker	Atenolol	50	393 (±79)	216	479	388 (±69)	229	455	298 (±39)	223	341	22.6% **	< 0.01
	Bisoprolol	50	688 (±174)	347	925	658 (±170)	385	884	534 (±84)	389	653	20.3% **	< 0.01
	Carvedilol	100	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-
	Celiprolol	50	352 (±86)	183	455	351 (±86)	190	442	349 (±68)	236	433	-1.1%	0.880
	Metoprolol	50	4148 (±1013)	2407	5489	4254 (±1079)	2274	5503	4422 (±870)	3166	5762	-8.6%	0.326
	Propranolol	25	74 (±20)	39	96	74 (±22)	34	98	75 (±18)	48	103	-4.3%	0.496
	Talinolol	25	38 (±9)	<LLOQ	49	37 (±11)	<LLOQ	52	40 (±8)	30	53	-5.3%	0.473
CC ² blocker	Diltiazem	50	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-
Diuretic	Torsemide	50	144 (±43)	70	195	138 (±42)	68	190	115 (±26)	69	147	19.1% **	0.023
	Triamterene	50	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	61 (±7)	<LLOQ	76	< -15.8% **	0.045
Lipid-lowering drug	Bezafibrate	50	1369 (±328)	694	1635	1354 (±310)	674	1668	683 (±120)	491	855	48.8% **	< 0.01
Neuroleptic	Haloperidol	50	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-
	Melperone	25	56 (±9)	44	73	54 (±11)	31	71	60 (±7)	50	69	-8.6%	0.597
Opioid analgesic	Tramadol	50	695 (±145)	381	882	673 (±135)	378	830	680 (±124)	455	801	0.9%	0.821
Vasodilating drug	Pentoxifylline	50	<LLOQ	<LLOQ	65	<LLOQ	<LLOQ	56	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-

¹angiotensin-converting enzyme

²calcium channel

** p<0.05, *p<0.1

In the validation process of the here used method samples were analyzed within a maximum storage time of one day (Gurke et al. 2015b). Stability tests were conducted to ensure the stability for the within this study used maximum storage time of four days in 50 mL centrifuge tubes. Therefore an influent and an effluent sample taken on March 16th 2015 were used. 300 mL of each sample was spiked with 600 μ L of a 1 mg/L stock solution, divided into twelve subsamples and stored at 4°C until the extraction. Extractions of three spiked influent and effluent subsamples, respectively, were done on Day 0 (Day of spiking), Day 1, Day 3 and Day 6. Every samples was extracted twice following the procedure described in Gurke et al. (2015). Results were calculated as mean value for each day and Day 0 was used as 100%. The results are shown in figure S1 A-F for the 56 investigated analytes. Telmisartan, carvedilol and clozapine showed strong irregularities especially in the effluent samples resulting in high standard deviations for the individual measurement days. The results of Day 1 of the effluent were not analyzable and were excluded from the further data processing.

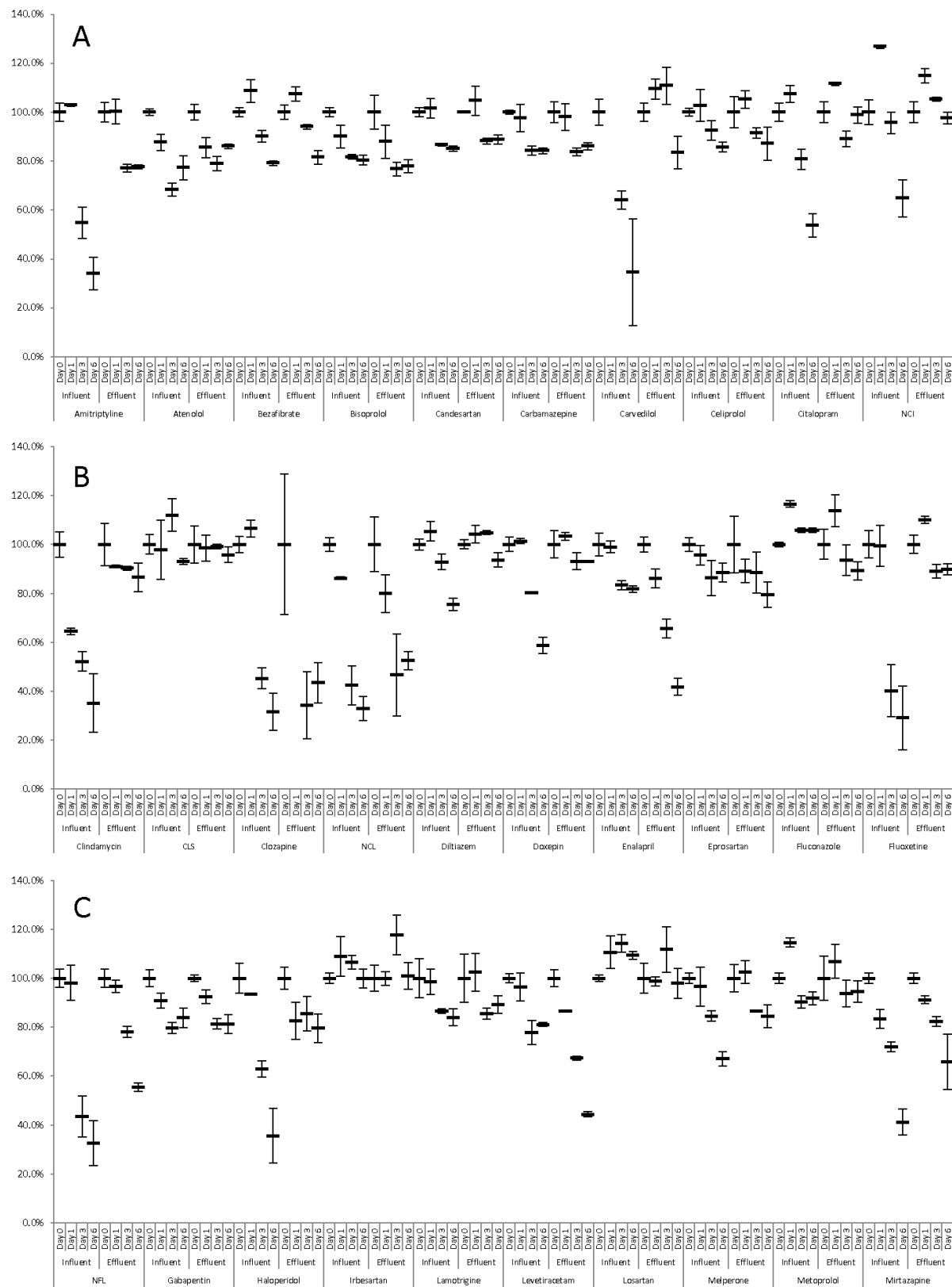


Figure S 1: Results of stability test (Day0, 1, 3 and 6) for spiked influent and effluent samples.

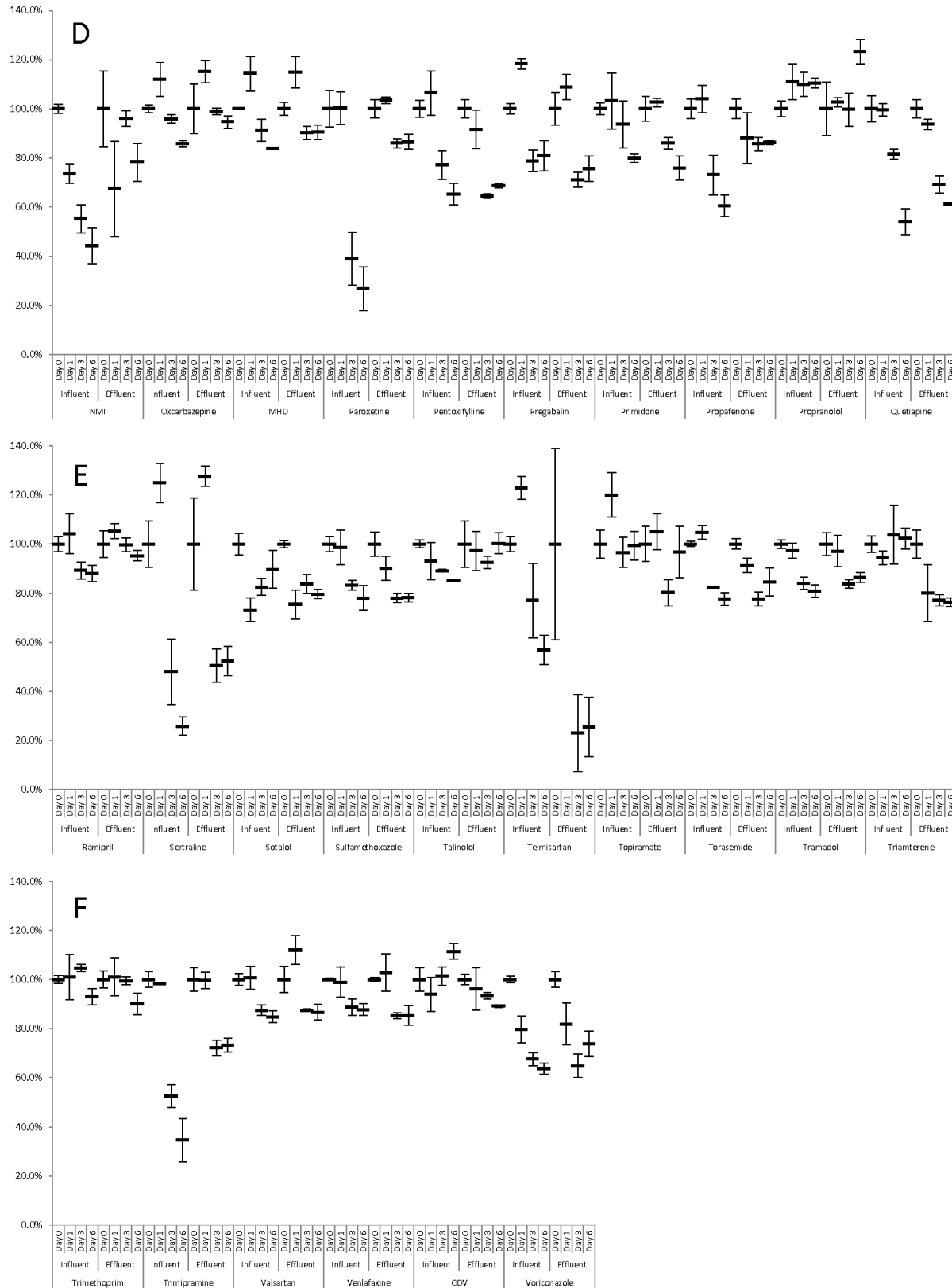


Figure S 2: Results of stability test (Day0, 1, 3 and 6) for spiked influent and effluent samples.

15 Danksagung

Ich möchte zuerst Prof. Dr. Dr. Wilhelm Kirch und Prof. Dr. Joachim Fauler für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die zahlreichen guten, fachlichen Gespräche danken. Ein besonderer Dank an dieser Stelle geht an Dr. Reinhard Oertel für die Betreuung, den fachlichen Austausch und die hilfreichen Ratschläge während meiner Promotionszeit.

Den Kollegen aus dem Labor, Julia Rossmann und Sara Schubert sowie Ute Mann und Kerstin Weber sei für die fachliche und experimentelle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Analysen im Labor gedankt.

Bei Hagen Eckert und Sara Teixeira sowie Conrad Marx möchte ich mich für die interessanten Gespräche bedanken, die den Blick über die Analytik von Arzneimitteln hinaus erweitert haben.

Ein besonderer Dank geht an die AOK PLUS, im Speziellen Andreas Fuchs, für die Bereitstellung der Verschreibungsdaten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ein ebenso besonderer Dank gilt Rita Knoche und Norbert Lucke von der Stadtentwässerung Dresden für die Bereitstellung der Abwasserproben.